

Primäre Immundefekte und Immundysfunktionen bei Kindern

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der
Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

M. Sc. Stephanie Heller

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst
Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Hans-Dieter Volk
 2. Prof. Dr. Horst von Bernuth
 3. Prof. Dr. Dirk Brockmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2020

Inhaltsverzeichnis

1. Vorbemerkung	1
2. Zusammenfassung	2
3. Abstract	4
4. Abkürzungsverzeichnis	6
5. Einleitung	12
5.1. Angeborene und adaptive Immunantwort	12
5.2. Intrazelluläre Signalwege des Immunsystems	14
5.2.1. Signalweg der humanen Toll-like- / IL-1-Rezeptoren	14
5.2.2. Klassischer und alternativer NF- κ B-Signalweg	16
5.2.3. IL-6-Signalweg	16
5.3. Primäre Immundefekte	19
5.3.1. Angeborene Störung der regulatorischen I κ B-Kinase Einheit IKK γ verursacht CID mit syndromalen Merkmalen (PID Klasse II)	20
5.3.2. AAk als Beispiel für PID-Phänokopien (PID Klasse IX)	22
5.3.2.1. AAk gegen den Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor	22
5.3.2.2. AAk gegen IFN- γ	22
5.3.2.3. AAk gegen IL-17A, IL-17F und IL-22	23
5.3.2.4. AAk gegen IL-6	24
5.4. Zielsetzung	25
6. Material & Methoden	26
6.1. Material	26
6.1.1. Zelllinien	26
6.1.2. Enzyme	26
6.1.3. Plasmide	26
6.1.4. Antikörper	27
6.1.5. Oligonukleotide	27
6.1.6. Reagenzien	28
6.1.7. Kits	30
6.1.8. Medium	30
6.1.9. Puffer (kommerziell)	30
6.1.10. Pufferzusammenstellung	31
6.1.11. Verbrauchsmaterial	31
6.1.12. Geräte	32
6.1.13. Software	33
6.2. Methoden	34
6.2.1. Isolation und Immortalisierung von humanen Fibroblasten	34
6.2.1.1. Isolation von primären Fibroblasten	34
6.2.1.2. Stabile Transfektion von primären Fibroblasten	34
6.2.2. Stimulation von SV40-immortalisierten Fibroblasten	34

6.2.2.1.	Nachweis von IL-6 im Zellüberstand nach Stimulation	34
6.2.2.2.	Anti-IL-6-Sandwich-ELISA	35
6.2.2.3.	Nachweis von I κ B α in Zelllysaten nach Stimulation	35
6.2.2.4.	SDS-Gelelektrophorese und Westernblot	36
6.2.3.	Analyse von Patienten mit Verdacht auf einen PID	37
6.2.3.1.	Nachweis von IL-6 und IL-10	37
6.2.3.2.	Intrazelluläre NEMO-Färbung	37
6.2.3.3.	DNA-Isolation aus SV40-immortalisierten Fibroblasten	38
6.2.3.4.	GoTaq-PCR	38
6.2.3.5.	RNA-Isolation aus SV40-immortalisierten Fibroblasten	38
6.2.3.6.	cDNA-Synthese	38
6.2.3.7.	RT-PCR	39
6.2.3.8.	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	39
6.2.3.9.	Aufreinigung der PCR-Produkte	39
6.2.3.10.	Isolation von mononukleären Zellen	40
6.2.4.	Analyse von Patienten mit Verdacht auf neutralisierende anti-IL-6-AAk	40
6.2.4.1.	Anti-IL-6-AAk-IgG-Sandwich-ELISA	40
6.2.4.2.	Anti-IL-6-AAk-IgG-Subklassen-ELISA	41
6.2.4.3.	Cross-Over-Experiment	41
6.2.4.4.	Phosphorylierung von STAT3 in humanen CD4 ⁺ T-Zellen	41
6.2.4.5.	Phosphorylierung von STAT3 in murinen pro B-Zellen	42
6.2.4.6.	Epitop-Mapping	42
6.2.4.7.	ELISA zum Nachweis der löslichen Rezeptoren sgp130 und sIL-6R	43
6.2.4.8.	Anti-Zytokin-AAk-Detektion mittels Multiplex-Analyse	43
7.	Ergebnisse	44
7.1.	Einschätzung der klinischen Prognose anhand des immunologischen Phänotyps bei Patienten mit NEMO-Defekt - Männlicher Patient mit erstbeschriebener hemizygoter <i>IKBKG</i> -Mutation in Donor-Spleißstelle	44
7.1.1.	Familienanamnese	44
7.1.2.	Immunologischer Phänotyp von P1A_m	45
7.1.2.1.	Zelluläre Immunität von P1A_m	45
7.1.2.2.	Humorale Immunität von P1A_m	47
7.1.2.3.	Funktionelle Analyse der angeborenen Immunität von P1A_m	48
7.1.3.	NEMO-Expression von P1A_m	48
7.1.4.	I κ B α -Abbau in SV40-Fibroblasten des Patienten P1A_m	50
7.1.5.	Produktion von IL-6 durch SV40-Fibroblasten	50
7.1.6.	Auswirkung der <i>IKBKG</i> -Mutation IVS9+1 G>A auf die C-terminale funktionelle ZF-Domäne	51
7.1.7.	Klinischer Verlauf von P1A_m	54
7.1.8.	Klinischer und immunologischer Phänotyp dreier NEMO-Defekt Patienten mit bekannter hemizygoter <i>IKBKG</i> -Mutation in der kodierenden Sequenz	55
7.1.8.1.	Klinischer Verlauf von Patient P1B_m	55
7.1.8.2.	Immunologischer Phänotyp von P1B_m	55
7.1.8.3.	Klinischer Verlauf von Patient P1C_m	58
7.1.8.4.	Immunologischer Phänotyp von P1C_m	59
7.1.8.5.	Klinischer Verlauf von Patient P1D_m	62
7.1.8.6.	Immunologischer Phänotyp von P1D_m	62
7.1.9.	NEMO-Expression von P1B_m, P1C_m und P1D_M	64

7.1.10.	Zusammenfassung - Immunologischer und klinischer Phänotyp von P1A_m, P1B_m, P1C_m und P1D_m	66
7.2.	Immunologischer und klinischer Phänotyp von Patienten mit anti-IL-6-AAk	67
7.2.1.	Identifizierung von spezifischen anti-IL-6-AAk in einem zuvor gesunden Patienten mit schwerer Lobärpneumonie	67
7.2.2.	Suche nach anti-IL-6-AAk in Patientenkohorten und Kontrollkohorten	69
7.2.3.	Überprüfung der neutralisierenden Wirkung von anti-IL-6-AAk durch Messung der STAT3-Phosphorylierung in humanen CD4 ⁺ T-Zellen	71
7.2.4.	Phosphorylierung von STAT3 in murinen Ba/F3-Zelllinien zur Analyse des klassischen / trans IL-6-Signalwegs	73
7.2.5.	Identifizierung von neutralisierenden anti-IL-6-AAk in bisher gesunden Individuen	74
7.2.6.	Bestimmung der anti-IL-6-IgG-AAk-Subklassen	77
7.2.7.	Ausschluss von AAK gegen weitere Zytokine in Patienten / Individuen mit anti-IL-6-AAk	78
7.2.8.	Epitop-Mapping	80
7.2.9.	Zeitlicher Verlauf des Ak-Titers	82
7.2.10.	Zusammenfassung – Prävalenz und Eigenschaften neutralisierender anti-IL-6-AAk	83
8.	Diskussion	84
8.1.	Einschätzung der klinischen Prognose anhand des immunologischen Phänotyps bei Patienten mit NEMO-Defekt	84
8.1.1.	Verlust der funktionellen ZF-Domäne verursacht typischen immunologischen Phänotyp und schweren klinischen Verlauf	84
8.1.2.	Untersuchung der angeborenen und adaptiven Immunität erlaubt eine Einschätzung der klinischen Prognose bei Patienten mit NEMO-Defekt	86
8.2.	Anti-IL-6-AAk - Phänokopie primärer ID?	87
8.2.1.	Die Prävalenz von anti-IL-6-AAk in Patienten mit bakteriellen Infektionen ist im Vergleich zu Patienten / Individuen ohne bakterielle Infektionen nicht erhöht	89
8.2.2.	Anti-IL-6-AAk von Patienten mit bakteriellen Infektionen erkennen spezifische, jedoch unterschiedliche IL-6-Epitope	90
8.3.	Ausblick	91
8.3.1.	Einschätzung der klinischen Prognose von Patienten mit NEMO-Defekt durch Untersuchung der angeborenen und adaptiven Immunität	91
8.3.2.	Neutralisierende anti-IL-6-AAk können, müssen jedoch nicht zu einer schweren bakteriellen Infektion führen	91
9.	Abbildungsverzeichnis	93
10.	Tabellenverzeichnis	94
11.	Literaturverzeichnis	95
12.	Appendix	111
12.1.	Klinische und immunologische Präsentation von Patienten mit <i>IKBKG</i> -Mutationen	111
12.2.	Anti-IL-6-AAk	121
12.2.1.	Patientenkohorte PK1	121
12.2.2.	Patient P1	121
12.2.3.	Patient P2	122
12.2.4.	Patientin P3	123

12.2.5.	Patientenkohorte PK2	124
12.2.6.	Patient P4	125
12.2.7.	Patientin P5	125
12.2.8.	Patientenkohorte PK3	125
12.2.9.	Kontrollkohorte KK1-3	126
12.2.10.	MN1 / N1	126
12.2.11.	MN2 / N2	126
12.2.12.	MN3 / N3	126
13.	Danksagung	127
14.	Eidesstattliche Erklärung	128

1. Vorbemerkung

Teilergebnisse der hier vorliegenden Arbeit wurden im *Journal of Clinical Immunology* veröffentlicht:

Heller S., Kölsch U., Magg T., Krüger R., Scheuern A., Schneider H., Eichinger A., Wahn V., Unterwalder N., Lorenz M., Schwarz K., Meisel C., Schulz A., Hauck F., von Bernuth H. T Cell Impairment Is Predictive for a Severe Clinical Course in NEMO Deficiency. *J Clin Immunol.* 2020 Jan 21. doi: 10.1007/s10875-019-00728-y. PubMed PMID: 31965418 [1].

2. Zusammenfassung

Die humane Immunantwort beruht auf einem System löslicher und zellulärer Komponenten, die als Erkennungs- und Abwehrmechanismus gegenüber Pathogenen und körpereigenen entarteten Zellen agieren, jedoch gesunde, apathogene Strukturen tolerieren. Beeinträchtigungen dieser Antwort durch angeborene, primäre Immundefekte (PID) oder Immundysfunktionen können zu einer lebensbedrohlichen Anfälligkeit für Infektionen, Tumorerkrankungen, Immundysregulationen, Autoimmun- oder Autoinflammationserkrankungen führen. In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit einem angeborenen Immundefekt (ID), der eine erhöhte Infektanfälligkeit beinhaltet, und anti-Zytokin-Autoantikörpern (AAk), die als PID-Phänokopien definiert werden, charakterisiert.

Der erste Abschnitt umfasst die Charakterisierung einer unbekannten *IKBKG*-Mutation (IVS9+1 G>A), die zu einer bisher unbeschriebenen NEMO-Defekt-Variante führt. NEMO-Defekte wurden bislang den Defekten der angeborenen Immunität zugeordnet. Die Mutation verursachte bei dem Patienten P1A_m jedoch einen zusätzlichen schweren T-Zelldefekt (erhöhte Anzahl an naiven CD45RA⁺ T-Zellen, reduzierte T-Zellproliferation nach Stimulation mit CD3/CD28), infolgedessen P1A_m in seinem ersten Lebensjahr vermehrt an schweren bakteriellen Infektionen (Sepsis und Osteomyelitis durch *E. aerogenes*, *P. jirovecii* Pneumonie) erkrankte. Die Analyse der NEMO-kodierenden Sequenz ergab, dass die in der Donor-Spleißstelle-liegende Mutation zum Verlust des neunten *IKBKG*-Exons und somit zu einem verkürzten, funktionell-eingeschränkten Protein führte. Im Vergleich mit vorbeschriebenen NEMO-Defekten wurde deutlich, dass das Spektrum der Erkrankungen durch *IKBKG*-Mutationen breiter als bisher angenommen ist. Die frühzeitige Charakterisierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort ist daher zur Abschätzung der individuellen Prognose und Einleitung einer individuellen Therapie notwendig.

Der zweite Abschnitt umfasst die Detektion und Charakterisierung von anti-Interleukin (IL)-6-AAk in einer Patientenkohorte von 349 Individuen, die an mindestens einer schweren bakteriellen Infektion erkrankt waren. Zwei Patienten wiesen anti-IL-6-AAk mit einem neutralisierenden Effekt auf die IL-6-Signaltransduktion auf (2/349, ~ 0,6 %). Im Vergleich dazu präsentierten ~ 0,4 % (2/564) einer Patientenkohorte mit Autoimmunerkrankungen, 0,0 % (0/366) einer Patientenkohorte mit mykobakteriellen Infektionen und ~ 0,1 % (1/988) von Individuen ohne bisherige schwere bakterielle Infektion neutralisierende AAK gegen IL-6. Des Weiteren wurden drei bislang gesunde Frauen identifiziert, die Trägerinnen von hoch-titrigen, neutralisierenden anti-IL-6-AAk sind und diese im letzten Trimester ihrer Schwangerschaft auf ihre Kinder übertragen haben. Diese wiesen kurz nach ihrer Geburt erhöhte IL-6-Konzentrationen, jedoch kein erhöhtes C-reaktives Protein (CrP) oder klinische Hinweise auf eine bakterielle Infektion auf.

Die Untersuchung der Antikörper (Ak)-Bindungsstellen von neun anti-IL-6-AAk (AAk von Patienten P1-P5, Müttern MN1-3 und Individuum KK2-1 aus Kontrollkohorte KK2) zeigte eine Bindung an IL-6-Epitope, die für die Bildung des di-heterotrimeren IL-6-Rezeptorkomplexes essentiell sind. Des Weiteren inhibierten die identifizierten AAK sowohl den klassischen (membranständiger IL-6-Rezeptor) als auch den trans (löslicher IL-6-Rezeptor) Signalweg von IL-6. Die Verlaufsanalyse der AAK-Titer über mehrere Jahre ergab, dass trotz persistentem (P2, MN1-2 und KK2-1) bzw. abfallendem AAK-Titer (P1, im Zeitraum von 3 ½ Jahren) keine weiteren bzw. neuen Infektionen eintraten. Zusammenfassend führen anti-IL-6-AAk einerseits zu einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen mit Pneumokokken und Staphylokokken, andererseits ist diese Anfälligkeit nicht in dem Maße ausgeprägt wie für mykobakterielle Infektionen durch anti-Interferon (IFN)- γ -AAk, Candida-Infektionen durch anti-IL-17-AAk oder invasive Pneumokokken- bzw. Staphylokokkeninfektionen bei angeborenen ID mit verminderter IL-6-Produktion oder Wirkung.

3. Abstract

The human immune response is based on a system of soluble and cellular components that serve as a detection and defense system against pathogens as well as endogenous degenerated cells while tolerating healthy apathogenic structures. Disturbances in the form of primary immunodeficiencies or immune dysfunctions can lead to life-threatening infections, tumor diseases, immune dysregulations, autoimmune or autoinflammatory diseases. The present thesis comprises the characterization of patients with primary immunodeficiencies who suffer from a higher susceptibility to infections as well as patients with anti-IL-6-autoantibodies which are defined as phenocopies of primary immunodeficiencies.

The first chapter refers to the analysis of an unknown *IKBKG* mutation (IVS9+1 G>A) resulting in an undescribed variant of NEMO-deficiency. These defects have been previously assigned to immunodeficiencies of the innate immunity. However, the mutation additionally leads to a severe T-cell defect (increased amounts of naive CD45RA⁺ T cells, reduced T cell proliferation upon stimulation with CD3/CD28), whereupon the patient P1A_m suffered from several severe bacterial infections in his first year of life (sepsis and osteomyelitis caused by *E. aerogenes*, *P. jirovecii* pneumonia). Analysis of the NEMO-coding sequence indicated that the mutation (located inside of an intervening sequence, donor splice site) leads to an exon 9 skipping and a shortened, functionally restricted protein. The range of diseases caused by *IKBKG* mutations is broader than previously presumed when compared to other NEMO-deficiencies. Therefore, the early characterization of innate and adaptive immune responses is essential for the assessment of the individual prognosis and therapy strategy.

The second chapter comprises the detection and characterization of anti-IL-6-autoantibodies in a cohort of 349 patients who suffered from at least one severe bacterial infection. Two patients presented autoantibodies with an inhibiting effect on the IL-6-induced signal transduction (2/349, ~ 0.6 %) whereas ~ 0.4 % (2/564) of patients with autoimmune diseases, 0.0 % (0/366) of patients with mycobacterial infections and ~ 0.1 % (1/988) of individuals without severe infections demonstrated neutralizing autoantibodies against IL-6. In addition, three so far healthy women with high-titer neutralizing anti-IL-6-autoantibodies, who transmitted them to their infants in the last trimester of pregnancy, were identified. The newborns presented increased concentrations of IL-6 after birth, but no elevated levels of C-reactive protein or clinical symptoms of bacterial infections. Analysis of the binding characteristics of nine detected anti-IL-6-autoantibodies (patients P1-5, females MN1-3 and the individual KK2-1 from the control cohort KK2) identified IL-6-binding sites that are essential for the formation of the di-heterotrimeric IL-6 signaling complex. Furthermore, the detected autoantibodies were able to inhibit both pathways: the classic (membrane-bound IL-6 receptor) and the trans (soluble IL-6 receptor) IL-6 signaling pathway.

The examination over several years revealed that, despite persistent (P2, MN1-2 and KK2-1) or decreasing (P1, in a period of 3 ½ years) antibody titers, no further or new infections occurred. In summary, anti-IL-6-autoantibodies seem to have an extenuated predisposition to severe infections, but this susceptibility is not as severe as in mycobacterial infections by anti-IFN- γ -autoantibodies, Candida infections by anti-IL-17-autoantibodies or pneumococcal / staphylococcal infections by primary immunodeficiencies with an impaired production or impact of IL-6.

4. Abkürzungsverzeichnis

A	Antibiotika
AAk	Autoantikörper
Ab	Abort
aCD3	Anti-CD3-Antikörper
Ak	Antikörper
AP1	Aktivatorprotein 1
APC	Allophycocyanin
APECED	<i>Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy</i>
APS-1	Autoimmunes polyendokrines Syndrom Typ 1
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ASA	Aminosäureaustausch
Ba/F3	Murine pro-B-Zelllinie
BAFF-R	<i>B-cell activating factor-receptor</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
BSF-2	<i>B cell stimulatory factor 2</i>
C	Corticosteroide
CAU	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
CC	<i>Coiled-coil</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CDS	<i>Coding sequence</i>
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CID	<i>Combined immunodeficiency</i>
CLC	<i>Cardiotrophin-like cytokine</i>
CMC	Chronische mukokutane Candidiasis
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>
cpm	<i>Counts per minute</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CrP	C-reaktives Protein
CT	Computertomografie
CT-1	<i>Cardiotrophin 1</i>
Δ	Deletion
D	Domäne
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DD	<i>Death domain</i>

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDA	Ektodermale Dysplasie mit Anhidrose
EDA-ID	EDA mit Immundefekt
EDA-ID-L	EDA mit Immundefekt und Lymphödem
EDA-ID-O	EDA mit Immundefekt und Osteopetrose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme-linked immuno spot assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas associated protein with death domain</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS	<i>Frameshift</i>
FWD	<i>Forward</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gDNA	Genomische DNA
GK	Gesunde Kontrolle / Kontrollkohorte
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
gp	Glykoprotein
gp130	β -Glykoprotein Untereinheit 130
GvHD	<i>Graft versus host disease</i>
HGG	Hypogammaglobulinämie
hIL-6	Humanes IL-6
HPGF	<i>Hybridoma-plasmacytoma growth factor</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSF	<i>Hepatocyte stimulating factor</i>
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
ID	Immundefekt
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I κ B	<i>Inhibitor of NF-κB</i>
I κ B α	<i>NF-κB inhibitor α</i>
IKBKG	<i>Inhibitor of NF-κB kinase subunit γ</i>
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin

IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-6R	IL-6-Rezeptor α
IP	Incontinentia pigmenti
IRAK	IL-1R-assoziierte Kinase
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
IUIS	<i>International union of immunological societies</i>
IVS	<i>Intervening sequence</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobase
KK1	Kontrollkohorte 1
KK2	Kontrollkohorte 2
KK2-1	Individuum aus Kontrollkohorte 2
KK3	Kontrollkohorte 3
Kr-Orange	<i>Krome-Orange</i>
L	Lebend
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	<i>Lipoteichoic acid</i>
LT β R	<i>Lymphotoxin βreceptor</i>
LZ	Leuzinzipper
m	Männlich
<i>M. chelonae</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBL	Mannose-bindendes Lectin
MD2	<i>Myeloid differentiation factor 2</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGI-2A	<i>Macrophage and granulocyte inducer type 2a</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mIL-6R	Membranständiger IL-6R
min	Minute
MMR	Mumps-Masern-Röteln
MN1	Mutter von Neonat 1
MN2	Mutter von Neonat 2
MN3	Mutter von Neonat 3
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>

MSMD	<i>Mendelian susceptibility to mycobacterial disease</i>
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
N1	Neonat 1
N2	Neonat 2
N3	Neonat 3
NaCl	Natriumchlorid
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NEMO ^{-/-}	NEMO-defiziente Zelllinie (Δ 4-10)
NF- κ B	<i>Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NFKBIA	<i>NF-κB inhibitor α</i>
NIH / NIAID	<i>National Institute of Health / National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
O	Osteopetrose
OD	Optische Dichte
OKT3	Anti-CD3-Antikörper
OSM	<i>Oncostatin M</i>
P	Patient
p	Phosphorylierung
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
p50	NF- κ B Untereinheit p50
p65	NF- κ B Untereinheit p65
Pa	Parasit
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PAP	Pulmonale Alveolarproteinose
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PCP	<i>Pneumococcal capsular polysaccharide</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCT	Procalcitonin
PE	Phycoerythrin
PE-Cy	Phycoerythrin/Cyanin
PHA	Phytohämagglutinin
Pi	Pilz
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PID	Primärer Immundefekt
PJP	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Pneumonie
PK1	Patientenkohorte 1
PK2	Patientenkohorte 2

PK3	Patientenkohorte 3
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMA/I	PMA / Ionomycin
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PTP	Prognose für trunkiertes Protein
PVP	Prognose für verkürztes Protein
PWM	<i>Pokeweed mitogen</i>
RA	Rheumatische Arthritis
RANK	<i>Receptor activator of NF-κB</i>
REV	<i>Reverse</i>
RIG	<i>Retinoic acid-inducible gene</i>
RIP	Rezeptor-interagierendes Protein
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	Reverse Transkriptase
RTE	<i>Recent thymic emigrants</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SAA	Serum Amyloid A
SAC	<i>S. aureus</i> Cowan I
SAD	Spezifischer Antikörperdefekt
SC	Stopcodon
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
sgp130	<i>Soluble gp130</i>
SI	Stimulationsindex
sIL-6R	<i>Soluble IL-6R</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
spp.	<i>Several species</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STIKO	Ständige Impfkommision
SV40	Simian-Virus 40
SZT	Stammzelltransplantation
T	Transplantation
TAB	TAK1-Bindungsprotein
TAK	TGF- β -aktivierte Kinase
TBK	TANK-bindende Kinase
T _{FH}	Follikuläre T-Helferzellen
TGF- β	<i>Tumor growth factor β</i>
TH	T-Helferzelle

TIR	Toll / IL-1-Rezeptor
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TK	Tageskontrolle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TNFR1	Tumornekrosefaktor Rezeptor 1
TP	Trunkiertes Protein
TRADD	<i>TNFR-associated death domain</i>
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter protein inducing IFN-β</i>
TZR	T-Zellrezeptor
V	Verstorben
VSC	Vorläufiges Stopcodon
VZV	Varizella-Zoster-Virus
w	Weiblich
w/o	<i>Without</i> bzw. ohne
ZF	Zinkfinger

5. Einleitung

5.1. Angeborene und adaptive Immunantwort

Das Immunsystem basiert auf der Interaktion verschiedener löslicher und zellulärer Komponenten, die als Erkennungs- und Abwehrmechanismus gegenüber Krankheitserregern, sogenannten Pathogenen, agieren. Des Weiteren kann es sich gegen nicht-infektiöse Fremdstoffe, wie im Fall einer allergischen Reaktion, sowie gegen entartete körpereigene Zellen richten. Man unterscheidet zwischen dem angeborenen, primären und dem adaptiven, sekundären Immunsystem [2, 3]. Die angeborene Immunität entwickelt sich in der frühen embryonalen Phase und beinhaltet anatomische, biochemische sowie zelluläre Barrieren [4]. Die primär vermittelte Immunreaktion geht aus den phagozytisch aktiven Makrophagen, neutrophilen Granulozyten sowie dendritischen Zellen hervor, die anhand von Mustererkennungsrezeptoren ein breites Spektrum an pathogenassoziierten Strukturen erkennen und in intrazellulären Vesikeln zerstören. Parallel dazu rekrutieren sie durch die Ausschüttung verschiedener Mediatoren, sogenannter Zytokine, weitere Zellpopulationen. Innerhalb des peripheren lymphatischen Gewebes präsentieren aktivierte dendritische Zellen mit Hilfe von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) Peptidstrukturen des ursprünglichen Pathogens an T-Zellen und aktivieren somit die adaptive Immunantwort [5].

Über autokrine IL-2-Stimulation kommt es zur Expansion der jeweiligen T-Zellpopulation ($CD8^+$ bzw. $CD4^+$) [6]. $CD8^+$ Effektor-T-Zellen, auch bekannt als Killerzellen, lösen mit Hilfe von zytotoxischen Effektorproteinen den Zelltod infizierter Zellen aus [2]. $CD4^+$ Effektor-T-Zellen differenzieren sich je nach umgebendem Zytokinmilieu in verschiedene T-Helferzellen (TH) mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften [7, 8]. TH_1 -Zellen aktivieren durch die Produktion von $IFN-\gamma$ die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen [7]. TH_2 -Zellen unterstützen durch die Ausschüttung von Zytokinen (IL-4, IL-5 und IL-13) eosinophile / basophile Granulozyten sowie Mastzellen bei der Bekämpfung von extrazellulären Parasiten [9]. TH_{17} -Zellen rekrutieren durch die Produktion von IL-17A, IL-17F und IL-22 wiederum weitere neutrophile Granulozyten [10, 11]. Follikuläre T-Helferzellen (T_{FH}) leiten durch die Produktion von Zytokinen die B-Zellaktivierung ein und tragen entscheidend zur Zelldifferenzierung sowie zum Antikörperklassenwechsel bei [12]. Aus den entstehenden T- und B-Zellpopulationen leiten sich langlebige spezifische Gedächtniszellen ab, die bei einem erneuten identischen Antigenkontakt eine verkürzte Expansionszeit sowie eine schnellere spezifische Antikörperproduktion besitzen [12] (Abbildung 1).

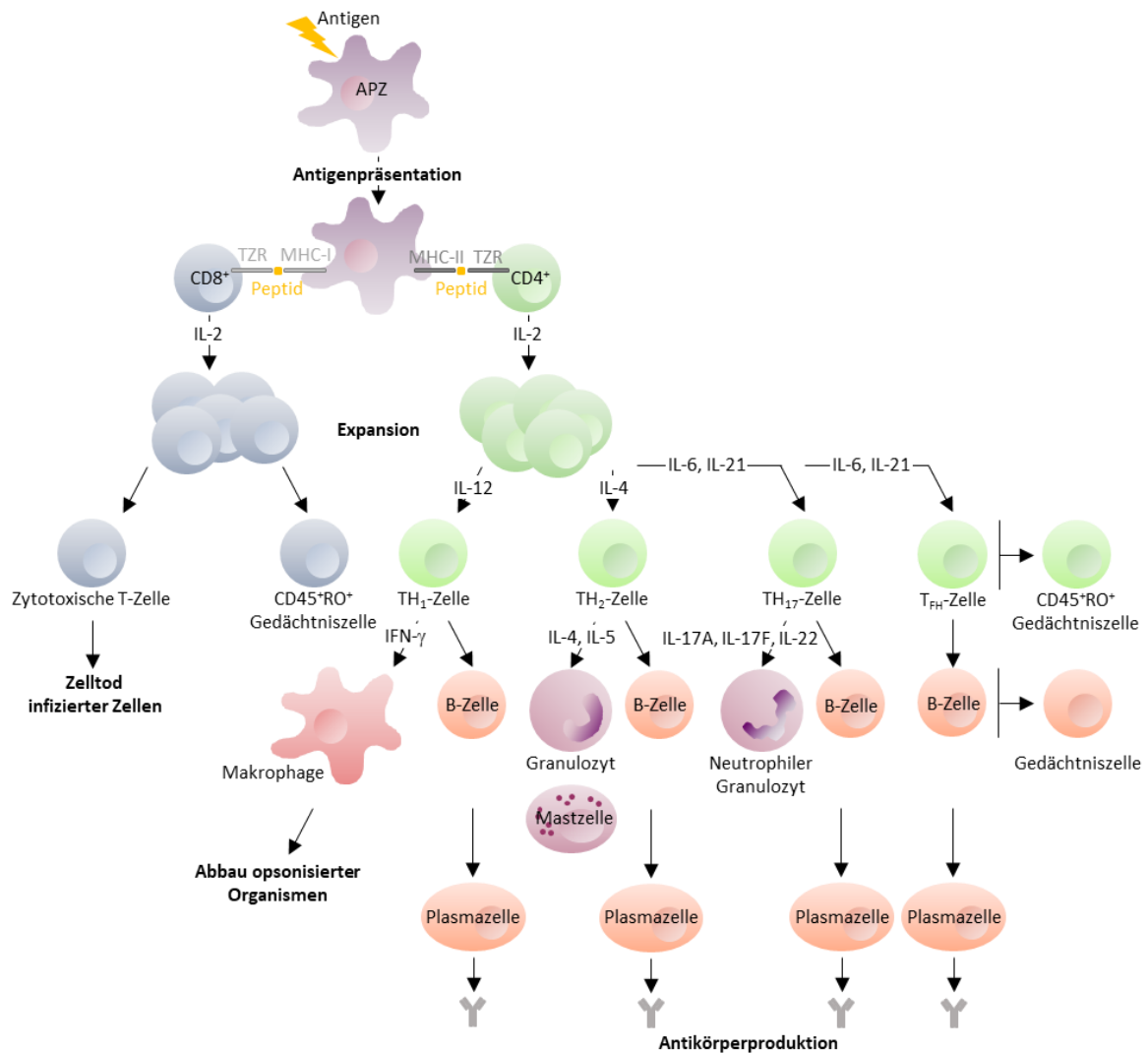


Abbildung 1. Die adaptive Immunantwort. Antigen-präsentierende Zellen (APZ) präsentieren mit Hilfe von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) der Klasse I bzw. II (MHC-I, MHC-II) Peptidstrukturen des Antigens an CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen. Mittels autokriner IL-2 Stimulation kommt es zur Proliferation der jeweiligen T-Zellpopulation, die sich je nach umgebenden Zytokinmilieu in zytotoxische CD8⁺ Effektor-T-Zellen (Killerzellen) oder in CD4⁺ T-Helferzellen (TH₁, TH₂, TH₁₇ bzw. T_{fh}) differenzieren. Über die Ausschüttung von Zytokinen werden Makrophagen, Granulozyten und B-Zellen aktiviert und die Produktion von spezifischen Ak eingeleitet. Aus den jeweiligen Zellpopulationen entwickeln sich Gedächtniszellen, die bei einem erneuten identischen Antigen-Kontakt eine kürzere Expansionszeit sowie eine schnellere spezifische Antikörperproduktion besitzen. CD, *Cluster of differentiation*; IFN, Interferon; IL, Interleukin; T_{fh}, Follikuläre T-Helferzellen; TH, T-Helferzelle; TZR, T-Zellrezeptor.

5.2. Intrazelluläre Signalwege des Immunsystems

5.2.1. Signalweg der humanen Toll-like- / IL-1-Rezeptoren

Die Basis der angeborenen Immunabwehr bilden Signalwege, die durch den Kontakt zwischen pathogenassoziierten Molekülen und Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) aktiviert werden. Die Struktur der Rezeptoren wird bereits in der Keimbahn kodiert und richtet sich sowohl gegen pathogene (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) als auch gegen entartete körpereigene Strukturen (*damage-associated molecular patterns*, DAMP). Diese Rezeptoren können in Form von Transmembranproteinen oder intrazellulären zytoplasmatischen Proteinen vorkommen. Sie werden in verschiedene Gruppen unterteilt, zu denen die Toll-like-, RIG (*retinoic acid-inducible gene*)-like- und NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-like-Rezeptoren gehören.

Das Toll-Protein und dessen Wirkmechanismus als Rezeptor innerhalb der Immunantwort wurde erstmals im Modell der *Drosophila melanogaster* Fliege beschrieben [13-15]. Durch den Nachweis ähnlicher Rezeptorstrukturen im humanen Immunsystem etablierte sich der Begriff der Toll-like-Rezeptoren (TLR) [16-18]. TLR sind auf Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, B- sowie T-Zellen exprimiert und besitzen drei strukturelle Domänen: eine extrazelluläre oder endosomale N-terminale Domäne zur Ligandenbindung, eine Transmembrandomäne sowie eine zytoplasmatische Toll / IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne, die Adaptermoleküle binden kann [19]. Die Familie der humanen TLR umfasst 10 Mitglieder. Sie erkennen extrazelluläre bakterielle Membrankomponenten (TLR1/2, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR2/6), endosomale Ribonukleinsäuren (*ribonucleic acid*, RNA) (TLR3, TLR7 und TLR8) oder Desoxyribonukleinsäuren (*deoxyribonucleic acid*, DNA) (TLR9). TLR1, TLR6 sowie TLR10 bilden mit TLR2 Heterodimere und binden Lipopeptide sowie Lipoteichonsäuren [20]. TLR3 bildet Homodimere und bindet doppelsträngige virale RNA sowie RNA-Strukturen von körpereigenen, abgebauten Zellen [21-23]. TLR4 bindet im Verbund mit CD14 und MD2 (*myeloid differentiation factor 2*) Lipopolysaccharide (LPS) [24-26], während Homodimere von TLR5 bakterielles Flagellin [27] und die von TLR7 und TLR8 einzelsträngige RNA erkennen [28, 29]. Homodimere von TLR9 binden bakterielle und virale unmethylierte CpG-reiche DNA-Bereiche [30, 31].

IL-1-Rezeptoren (IL-1R) binden Zytokine der IL-1-Familie (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36), die sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen können [32]. Sie bestehen aus einer extrazellulären Domäne (drei Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domänen), einer Transmembrandomäne sowie einer intrazellulären Domäne, die der intrazellulären Domäne der TLR gleicht und daher TIR-Domäne genannt wird [33-35].

Der Ligand-Rezeptor-Kontakt führt zur Bindung rezeptorspezifischer intrazellulärer Adapterproteine (MyD88, *myeloid differentiation primary response* → Bildung eines Signalkomplexes, dem sogenannten MyDDosom [36, 37]; TIRAP, *TIR domain-containing adaptor protein*; TRIF, *TIR domain-containing adapter protein inducing IFN- β* ; TRAM, *TRIF-related adaptor molecule* [38-41]). Dieser Interaktion folgt die Bindung von IL-1R-assoziierten Kinasen (IRAK), deren Phosphorylierung zur Aktivierung weiterer Proteinkomplexe, wie dem heterotrimeren I κ B-Kinase (IKK)-Komplex, führt. Der IKK-Komplex phosphoryliert die inhibitorische Einheit I κ B α , die daraufhin proteosomally abgebaut wird. Der zytoplasmatisch an diesen Inhibitor gebundene Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B-cells*) kann anschließend in den Nukleus wandern [19, 42, 43] (Abbildung 2).

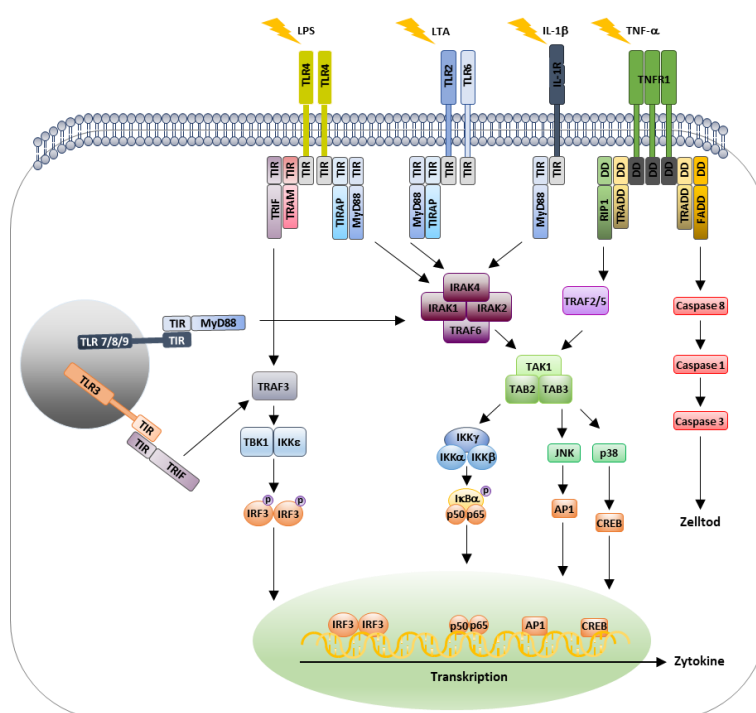


Abbildung 2. Signalwege des angeborenen Immunsystems. Zu den TLR-Agonisten gehören unter anderem Lipopolysaccharid (LPS → TLR4) oder Lipoteichonsäuren (*lipoteichoic acid*, LTA → TLR2/TLR6). Zytokine wie IL-1 β und TNF- α binden an die entsprechenden Rezeptoren. Die Signaltransduktion erfolgt über die Bindung der zytoplasmatischen Rezeptordomänen an nachfolgende Adaptermoleküle: TIR-Domäne → TRIF, TRAM, TIRAP und MyD88; DD-Domäne → RIP1, TRADD und FADD. Die daraus resultierende Aktivierung des IRF3-, NF- κ B- bzw. MAPK-Signalwegs führt zur Translokation der jeweiligen Transkriptionsfaktoren (IRF3, NF- κ B, AP1, CREB) in den Nukleus und zur Transkription. Parallel dazu kann die Aktivierung von DD-tragenden Molekülen den programmierten Zelltod über die Caspase-Signalkaskade einleiten. AP1, Aktivatorprotein 1; CREB, *cAMP response element-binding protein*; DD, *Death domain*; FADD, *Fas associated protein with death domain*; I κ B α , *NF- κ B inhibitor α* ; IKK, I κ B-Kinase; IL-1 β , Interleukin-1 β ; IL-1R, Interleukin-1 Rezeptor; IRAK, IL-1R-assoziierte Kinase; IRF, *Interferon regulatory factor*; JNK, c-Jun N-terminale Kinase; MAPK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase; p, Phosphorylierung; p38, p38-mitogenaktivierte Proteinkinase; p50, NF- κ B Untereinheit p50; p65, NF- κ B Untereinheit p65; RIP, Rezeptor-interagierendes Protein; TAB, TAK1-Bindungsprotein; TAK, TGF- β -aktivierte Kinase; TBK, TANK-bindende Kinase; TIR; Toll / IL-1-Rezeptor; TIRAP, *TIR domain-containing adaptor protein*; TLR, Toll-like-Rezeptor; TNF- α , Tumornekrosefaktor- α ; TNFR1, Tumornekrosefaktor Rezeptor 1; TRAF, TNF-Rezeptor assoziierter Faktor; TRADD, *TNFR-associated death domain*; TRAM, *TRIF-related adaptor molecule*; TRIF, *TIR domain-containing adapter-inducing interferon- β* .

5.2.2. Klassischer und alternativer NF- κ B-Signalweg

Es handelt sich bei dem Transkriptionsfaktor NF- κ B um einen homo- bzw. heterodimeren Proteinkomplex, der sich aus den Rel-Proteinen NF- κ B1 / p50 (Vorläuferprotein p105), NF- κ B2 / p52 (Vorläuferprotein p100), RelA (p65), RelB oder c-Rel zusammensetzt [44]. Innerhalb des klassischen, kanonischen Signalwegs liegt der heterodimere Faktor NF- κ B (p50/p65) durch die Bindung an zytoplasmatische inhibitorische Proteine (*inhibitor of NF- κ B*, I κ B), wie I κ B α , I κ B β oder I κ B ε , überwiegend im Zytoplasma einer Zelle vor. Wird diese stimuliert, kommt es zur Aktivierung des trimeren IKK-Komplexes aus den Komponenten IKK α , IKK β und IKK γ . Dieser führt zur Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und zum proteosomalen Abbau der inhibitorischen Einheiten, woraufhin NF- κ B in den Zellkern wandert und Transkriptionen auslöst [45, 46]. Anschließend erfolgt die Re-Synthese des inhibitorischen I κ B-Proteins, wodurch das Verhältnis von nukleärem und zellulärem Transkriptionsfaktor wieder zugunsten des Zytoplasmas verschoben wird [47, 48]. Im Vergleich dazu beinhaltet der alternative, nicht-kanonische NF- κ B-Signalweg einen heterodimeren Transkriptionsfaktor aus den Rel-Proteinen p100 / RelB, welcher durch die Rezeptoren CD40 (*cluster of differentiation 40*), BAFF-R (*B-cell activating factor-receptor*), LT β R (*lymphotoxin β receptor*) und RANK (*receptor activator of NF- κ B*) kontrolliert wird. Eine NF- κ B-induzierende Kinase (NF- κ B-inducing kinase, NIK) führt zur Phosphorylierung des homodimeren IKK α -Komplexes, der das inhibierende Vorläuferprotein p100 in das aktive Rel-Protein p52 umwandelt. Der daraus resultierende NF- κ B Faktor p52 / RelB wandert in den Zellkern und löst Transkriptionen aus [47, 48].

5.2.3. IL-6-Signalweg

Im Jahr 1980 wurden zwei biologisch aktive *messenger*-RNA (mRNA)-Varianten von IFN in humanen Fibroblasten nach Stimulation mit Polyinosin und Polycytidylsäure identifiziert und als IFN- β_1 bzw. IFN- β_2 beschrieben [49, 50]. Das größere Protein, IFN- β_2 , wurde in den darauffolgenden Jahren als 26 kDa Protein [51, 52], Hybridoma-Plasmazytoma-Wachstumsfaktor (*hybridoma-plasmacytoma growth factor*, HPGF), B-Zell-stimulierender Faktor (*B cell stimulatory factor 2*, BSF-2) [53-55], Hepatozyten-stimulierender Faktor (*hepatocyte stimulating factor*, HSF) [55, 56] oder Makrophagen / Granulozyten Induktor Typ 2A (*macrophage and granulocyte inducer type 2a*, MGI-2A) [57] bezeichnet. Die spätere Analyse der komplementären DNA (*complementary DNA*, cDNA)-Sequenz offenbarte, dass es sich um dasselbe Protein handelte, so dass eine einheitliche Bezeichnung in Form von IL-6 erfolgte [58-60]. IL-6 ist in seiner unreifen Form 212 Aminosäuren (AS) lang und enthält im N-terminalen Bereich ein Signalpeptid (AS 1-28) [61, 62]. Das biologisch aktive Protein umfasst 184 AS und bildet in seiner tertiären Proteinstruktur vier Helix-Stränge (A-D) [63, 64].

IL-6 gehört mit seinen anti- und pro-inflammatorischen Eigenschaften zu den pleiotropen Zytokinen der Immunantwort und wird von Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen sowie Endothelzellen exprimiert [65]. Unter physiologischen Bedingungen liegt es im peripheren Blut in sehr geringer Konzentration (1-5 pg/ml) vor [66]. IL-6 fördert die Differenzierung von Ig-produzierenden B-Zellen [61, 67] und zytotoxischen CD8⁺ Effektor-T-Zellen [68]. Parallel dazu kann es in Verbindung mit dem Tumor-Wachstumsfaktor β (*tumor growth factor*, TGF- β) die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu TH₁₇-Zellen begünstigen und die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen hemmen [69-71]. Zusätzlich unterstützt es die Proliferation und Reifung von hämatopoetischen Stammzellen [72-74]. Eine zu starke Produktion kann zu Autoimmun- (rheumatische Arthritis (RA), systemischer Lupus erythematodes (SLE) oder Morbus Crohn) [66, 75] oder Autoinflammationserkrankungen (*Castleman's Disease* [76, 77] und systemische juvenile idiopathische Arthritis [78, 79]) führen. Des Weiteren kann die Anhäufung von IL-6 die Entstehung von malignen Erkrankungen begünstigen [80, 81].

Die vielleicht bekannteste physiologische Rolle spielt IL-6 in der Akut-Phase-Antwort als Hepatozyten-stimulierender Faktor (HSF) [55, 56, 82-84]. Die Stimulation von Hepatozyten führt zur Ausschüttung von Akut-Phase-Proteinen, wie CrP, Serum Amyloid A (SAA), Fibrinogen und Haptoglobin, bzw. zur verminderten Bildung von Albumin [85, 86]. IL-6 bildet zusammen mit seinem IL-6-Rezeptor α (IL-6R) und der Signal-übermittelnden β -Glykoprotein Untereinheit 130 (gp130) einen hexameren Signalkomplex [87] und aktiviert somit die JAK (*janus kinase*) / STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-, MAPK- und PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase)-Signalwege, welche den Zellmetabolismus, die Proliferation und die Apoptose kontrollieren [88-91]. Gp130 wird ubiquitär auf der Zelloberfläche exprimiert und dient dadurch auch anderen Zytokinen der IL-6-Familie (IL-11; *ciliary neurotrophic factor*, CNTF; *leukemia inhibitory factor*, LIF; *Oncostatin M*, OSM; *Cardiotrophin 1*, CT-1; *Cardiotrophin-like cytokine*, CLC; IL-27) als Rezeptor [92]. Der membranständige IL-6R ist hingegen vorwiegend auf Hepatozyten, Megakaryozyten und Leukozyten zu finden. Durch alternatives Spleißen oder Metalloproteasen [93] entstehen lösliche Varianten von gp130 (*soluble gp130*, sgp130) und IL-6R (*soluble IL-6R*, sIL-6R), die unter physiologischen Bedingungen in einer Konzentration von 250-400 ng/ml (sgp130) und 50-75 ng/ml (sIL-6R) im peripheren Blut vorliegen [94, 95]. Man differenziert zwischen zwei Signalwegen, dem klassischen und dem trans IL-6-Signalweg (Abbildung 3A). Der klassische Weg beinhaltet einen hexameren Signalkomplex aus zwei IL-6 Molekülen, zwei membranständigen IL-6R sowie zwei membranständigen gp130 Untereinheiten. Seine Aktivierung wirkt anti-inflammatorisch. Der trans Signalweg beinhaltet wiederum einen hexameren Signalkomplex aus zwei IL-6 Molekülen, zwei löslichen IL-6R und zwei membranständigen gp130 Untereinheiten [96]. Durch die Bindung von sIL-6R an ubiquitär exprimiertes gp130 werden auch IL-6R-negative Zellpopulationen, wie Endothelzellen [97], Muskelzellen [98] oder Keratinozyten [99], aktiviert.

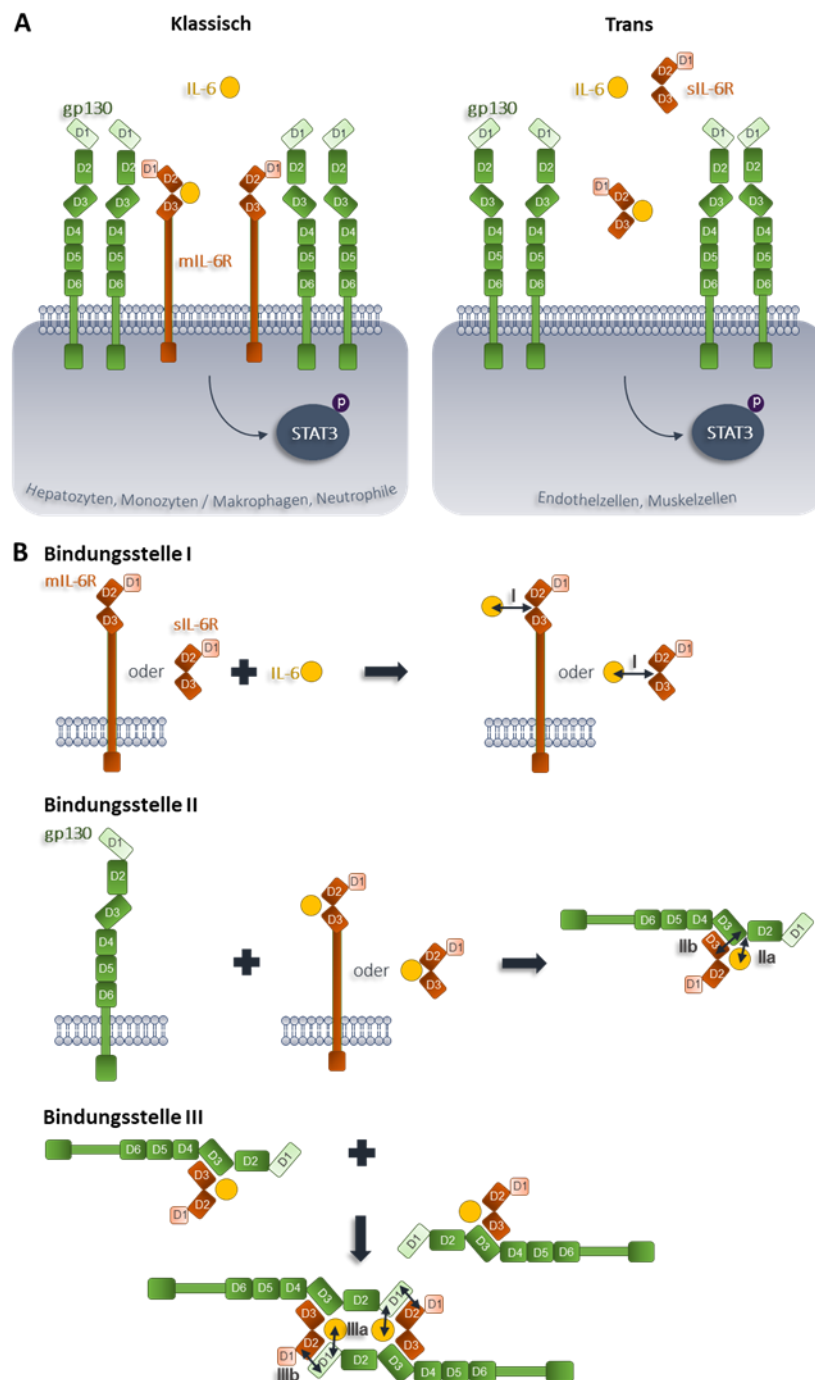


Abbildung 3. Klassischer und trans IL-6-Signalweg. (A) Der klassische IL-6-Signalweg beinhaltet einen hexameren Signalkomplex aus IL-6 und den membranständigen Rezeptoren IL-6R (mIL-6R) sowie gp130 (links). Innerhalb des trans Signalwegs bildet sich der Komplex aus IL-6, dem löslichen IL-6R (sIL-6R) und dem membranständigen gp130 (rechts). (B) Der hexamere IL-6/IL-6R/gp130-Signalkomplex wird über drei Bindungsstellen vermittelt (I-III). Die erste Bindungsstelle (I) verbindet IL-6 mit mIL-6R bzw. sIL-6R zu einem heterodimeren Komplex. Die zweite Bindung erfolgt zwischen IL-6/IL-6R und einem membranständigen gp130 über die Bindungsstellen IIa und IIb. Die dritte Bindung formt aus zwei IL-6/IL-6R/gp130-Heterotrimeren einen hexameren Proteinkomplex über die Bindungsstellen IIIa und IIIb. D, Domäne; gp, Glykoprotein; IL-6, Interleukin-6; sIL-6R, Löslicher IL-6-Rezeptor; p, Phosphorylierung; STAT, *Signal transducer and activator of transcription*.

Der trans Signalweg besitzt eine pro-inflammatorische Wirkung und fördert die Entwicklung zytotoxischer CD8⁺ Effektor-T-Zellen [100]. Im Gegensatz zum klassischen Weg wird der trans Signalweg durch einen natürlichen Inhibitor, dem löslichen sgp130, kontrolliert. Die Bildung der jeweiligen hexameren Signalkomplexe basiert auf drei Bindungsstellen. Die erste Bindungsstelle (I) verbindet IL-6 und IL-6R bzw. sIL-6R zu einem Heterodimer. Dieses formt zusammen mit einem membranständigen gp130 über die Bindungsstellen IIa und IIb einen trimeren Proteinkomplex. Im Anschluss verbinden sich zwei IL-6/IL-6R/gp130-Heterotrimere über die Bindungsstellen IIIa und IIIb zum hexameren IL-6-Signalkomplex [101, 102] (Abbildung 3B).

5.3. Primäre Immundefekte

Unter der Schirmherrschaft der *World Health Organisation* wurde im Jahr 1970 ein Komitee ins Leben gerufen, welches angeborene PID und Immundysfunktionen klassifiziert [103]. Im aktuellen Bericht der *International Union of Immunological Societies (IUIS)* sind 354 Erkrankungen gelistet, die auf 344 PID zurückgeführt [104, 105] und unter Berücksichtigung ihres klinischen und immunologischen Phänotyps in neun Klassen gegliedert wurden. Die erste Klasse (I) beschreibt kombinierte ID der zellulären und humoralen Immunantwort. Sie beinhaltet sowohl schwere Varianten (*severe combined immunodeficiency*, SCID), denen ein T-Zelldefekt zu Grunde liegt (T-Zellen⁻/B-Zellen⁻ oder T-Zellen⁻/B-Zellen⁺), als auch kombinierte ID (*combined immunodeficiency*, CID) mit einer schwächeren Ausprägung. Die zweite Klasse (II) umfasst CID mit Syndrom oder Syndromartigen Eigenschaften, wie dem Hyper-IgE-Syndrom [106, 107] oder der ektodermalen Dysplasie mit Anhidrose und ID (EDA-ID) [108]. Die dritte Klasse (III) beschreibt ID, die die Antikörperproduktion aufgrund abwesender oder stark reduzierter B-Zellen beeinträchtigen. Zusätzlich werden auch Varianten ohne B-Zell-Einschränkung aufgelistet. Die vierte Klasse (IV) beinhaltet Fehlregulierungen, die zur Ausprägung eines hyperinflammatorischen Syndroms in Form einer hämophagozytischen Lymphohistiozytose, einer erhöhten Anfälligkeit für virale Infektionen oder Autoimmunerkrankungen [109] führen. Die fünfte Klasse (V) umfasst ID, die die Quantität und/oder Qualität von Phagozyten beeinträchtigen. Die sechste Klasse (VI) beschreibt Defekte der angeborenen und adaptiven Immunantwort, die eine selektive Prädisposition für bakterielle [110-112], virale [22] oder mykobakterielle [113] Infektionen aufweisen. Die siebte Klasse (VII) beinhaltet auto-inflammatorische Erkrankungen, denen ein angeborener Defekt zu Grunde liegt. Dabei kann es sich um Interferonopathien oder Beeinträchtigungen des Inflammasoms handeln. Die achte Klasse (VIII) umfasst ID des Komplementsystems, die sich auf die einzelnen Komponenten des klassischen, alternativen aber auch Lektin-Wegs auswirken können. Die letzte Klasse (IX) beschreibt PID-Phänokopien, die durch somatische Mutationen oder AAK gegen Zytokine [114, 115] bzw. gegen Komponenten des Komplementsystems verursacht werden.

5.3.1. Angeborene Störung der regulatorischen I κ B-Kinase Einheit IKK γ verursacht CID mit syndromalen Merkmalen (PID Klasse II)

Patienten mit einem PID innerhalb des kanonischen bzw. nicht-kanonischen NF- κ B-Signalwegs leiden unter einer erhöhten Anfälligkeit für bakterielle, mykobakterielle und virale Infektionen. Auch schwere Spross- / Fadenpilzinfektionen konnten bei einzelnen Patienten nachgewiesen werden [104, 105]. Innerhalb des klassischen, kanonischen NF- κ B-Signalwegs sind PID mit Mutationen in folgenden Genen bekannt: *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *IKBKA*, *IKBKB*, *IKBKG*, *NFKBIA*, *NFKB1* und *RELA*. Die von *IKBKG*-kodierte regulatorische IKK γ -Einheit ist Bestandteil des trimeren I κ B-Kinase-Komplexes (IKK α /IKK β /IKK γ), welcher in seiner aktiven Form zur Phosphorylierung der inhibitorischen Einheit I κ B α führt. Das X-chromosomal (Xq28) liegende Gen *IKBKG* (*inhibitor of NF- κ B kinase subunit γ*) beinhaltet zehn Exons (NM_001099857.2), von denen neun die Protein-kodierende Sequenz (*coding sequence*, CDS) definieren (NP_001093327.1). Das daraus resultierende Protein, auch bekannt als NEMO (*NF- κ B essential modulator*), verfügt über eine Länge von 419 AS sowie über vier funktionelle Domänen, bei denen es sich um zwei *coiled-coil* (CC) Domänen im Bereich der AS 63-193 (CC1) bzw. 258-298 (CC2), einen Leuzinzipper (LZ) im Bereich der AS 319-346 sowie eine hoch-konservierte Zinkfinger (ZF)-Domäne im Bereich der AS 397-417 [116, 117] handelt (Abbildung 4).

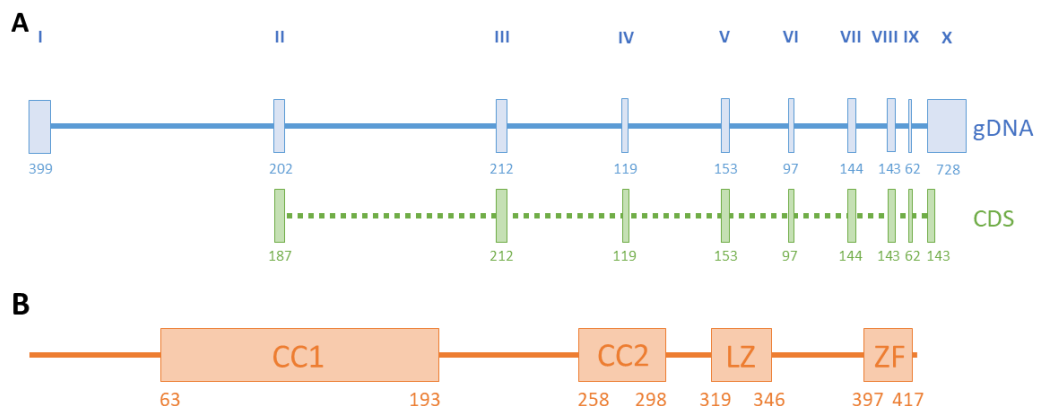


Abbildung 4. Schematische Darstellung von *IKBKG* und NEMO. (A) Das Gen *IKBKG* verfügt unter Berücksichtigung der Transkriptionsvariante 1 (NM_001099857.2) auf genomischer DNA-Ebene über zehn Exons (I-X, blau, gDNA), von denen neun an der Protein-kodierenden Sequenz (grün, CDS) beteiligt sind. (B) Das daraus resultierende NEMO-Protein besitzt 419 AS und bildet vier funktionelle Domänen (CC1-, CC2-, LZ- und ZF-Domäne), die an der Oligomerisierung sowie der Signaltransduktion beteiligt sind. AS, Aminosäure; CC, *Coiled-Coil* Domäne; CDS, *Coding sequence*; LZ, Leuzinzipper; ZF, Zinkfinger.

Die bisher identifizierten *IKBKG*-Mutationen führen zur Ausprägung von amorphen bzw. hypomorphen Proteinstrukturen. Die amorphen Varianten führen bei heterozygoten weiblichen Trägerinnen zur Ausprägung des Bloch-Sulzberger-Syndroms, auch bekannt als Incontinentia pigmenti (IP) [108, 118]. Die Patientinnen weisen in ihrer frühen Kindheit Hautanomalien (Bläschenbildung, Hypo- und/oder Hyperpigmentierung), spärlichen Haarwuchs sowie eine eingeschränkte Zahnentwicklung (konisch geformte Zähne, verzögerter Zahndurchbruch) auf. Amorphe Varianten sind bei hemizygoten, männlichen Trägern tödlich [46]. Diese Letalität wurde in einem Mausmodell auf eine schwere Degeneration der Leber zurückgeführt [119].

Bei hypomorphen Proteinvarianten mit Restaktivität besteht eine residuale Signaltransduktion in quantitativ unterschiedlichem Ausmaß über den NF- κ B-Signalweg. Sie können sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Trägern zur Ausprägung einer EDA führen [45, 46, 120]. Patienten mit einer EDA weisen Fehlbildungen in den ektodermalen Geweben auf, die sich in Form einer eingeschränkten Zahnentwicklung, retinaler Dysplasie, trockener Haut (fehlende bzw. funktional eingeschränkte Schweißdrüsen), Pigmentstörungen sowie spärlichem Haarwuchs manifestieren. Je nach Ausprägung differenziert man zwischen einer milden und einer starken EDA. Manche Patienten weisen zusätzlich eine Beeinträchtigung der Immunantwort auf. In diesen Fällen spricht man von einer EDA mit ID (EDA-ID) [117, 121-123]. Der immunologische Phänotyp dieser Patienten ist breit gefächert und kann trotz Impfung oder Infektion eine fehlende bzw. stark verminderte Produktion von Polysaccharid-spezifischen Ak, einen niedrigen Spiegel an IgG (vor allem innerhalb der Subklasse IgG₂), ein Hyper-IgM-Syndrom [124], Einschränkungen der zytotoxischen Wirkung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [125] sowie eine verminderte Anzahl an klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen umfassen. Des Weiteren können die Patienten eine verminderte inflammatorische Reaktion nach Stimulation mit LPS, IL-1 β und TNF- α aufweisen. NEMO-defiziente Patienten können sich auch ohne EDA präsentieren. Neben EDA und ID können eine übermäßige Verhärtung des Knochengewebes, eine sogenannte Osteopetrose (EDA-ID-O), und Lymphödeme (EDA-ID-L, EDA-ID-OL) hinzukommen [126, 127]. Die Therapieansätze müssen aufgrund der variablen Verläufe und der unterschiedlichen Schweregrade individuell gewählt werden. Die Optionen reichen dabei von regelmäßig durchgeführten Kontrolluntersuchungen, über eine antibiotische Therapie (bei akuter Infektion bzw. als Prophylaxe), eine regelmäßige IgG-Substitution bis hin zu einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) [128].

5.3.2. AAK als Beispiel für PID-Phänokopien (PID Klasse IX)

AAk werden aufgrund ihres neutralisierenden Wirkmechanismus und dem damit einhergehenden klinischen Phänotyp, der dem eines PIDs (Rezeptordefekt, Produktions- bzw. Signalwegdefekt) ähnelt, als PID-Phänokopie definiert. Im Folgenden werden vier anti-Zytokin-AAk-Varianten genauer vorgestellt, für die eine begünstigende Rolle für Infektionen als gesichert gelten kann [104, 105].

5.3.2.1. AAK gegen den Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor

Der Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) ist an der Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen, der Proliferation und Aktivierung von Granulozyten / Makrophagen beteiligt und wird von T-Zellen, Makrophagen und Fibroblasten exprimiert [129, 130]. Mutationen innerhalb der GM-CSF-Rezeptor-kodierenden Gene *CSF2RA* und *CSF2RB* führen durch Ansammlung Lipoprotein-haltiger Flüssigkeit zu einer pulmonalen Alveolarproteinose (PAP) [131-134]. In 90 % aller PAP-Fälle sind jedoch AAK gegen GM-CSF die Ursache für die klinische Manifestation [135-137]. Die Patienten leiden unter einer verminderten Atmungsaktivität sowie einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen durch *Nocardien*, *Kryptokokken* und Schimmelpilze (*Aspergillus fumigatus*) [138-140]. Im Vergleich zum PID entwickeln jedoch nicht alle anti-GM-CSF-AAk-tragenden Patienten eine PAP [141, 142], so dass von keiner 100%igen Phänokopie der Rezeptordefekte ausgegangen werden kann.

5.3.2.2. AAK gegen IFN- γ

IFN- γ fördert die Aktivierung von Monozyten, Makrophagen sowie von dendritischen Zellen und unterstützt dadurch den Abbau von infizierten Zellen. Es wird vornehmlich von TH₁-Zellen sowie von NK-Zellen gebildet. Defekte im Bereich der IL-12/IL-23/IFN- γ -Signalweg-Rezeptoren (Gene *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IL12RB1*, *IL12B*) oder in intrazellulär vorliegenden Komponenten (Gene *CYBB*, *JAK1*, *TYK2*, *STAT1*, *IKBKG*, *RORC* oder *IRF8*) sowie in der Produktion von IFN- γ -induzierenden Zytokinen (Gen *ISG15*) führen zu einer erhöhten Anfälligkeit für mykobakterielle Infektionen, der sogenannten *mendelian susceptibility to mycobacterial disease* (MSMD) [143-145]. Des Weiteren können die Patienten an schweren invasiven Salmonellosen und Candida-Infektionen erkranken [146]. Die ersten Berichte von anti-IFN γ -AAk-tragenden Patienten erschienen im Jahr 2004 [147, 148].

Dabei handelte es sich um eine thailändische Patientin, die an einer schweren Infektion durch *Burkholderia cocovenenans* und *Mycobacterium chelonae* erkrankte [147] sowie um einen philippinischen Patienten, der an einer langwierigen disseminierten Infektion durch *M. tuberculosis* und *M. chelonae* litt [148]. Beide Patienten verstarben trotz eingeleiteter Therapie. Es folgten weitere Berichte von zuvor gesunden Individuen, die aufgrund von anti-IFN- γ -AAk an schweren opportunistischen Infektionen (durch *Salmonella spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium marneffe* und Varizella-Zoster-Virus, VZV) erkrankten. Die Mehrheit der anti-IFN- γ -AAk-tragenden Patienten stammt aus dem asiatischen Raum [149, 150], aber auch Einzelfälle mit kaukasischer Abstammung wurden beschrieben [151-153]. Anti-IFN- γ -AAk sind bisher die einzigen AAK, für deren Bildung eine genetische Prädisposition in Form der HLA-Genotypen HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB1*15:02, HLA-DRB1*16:02 sowie HLA-DQB1*05:01 und HLA-DQB1*05:02 vermutet wird [154-156]. Durch die Identifizierung eines anti-IFN- γ -AAk-spezifischen Epitops, welches in seiner AS-Sequenz zu 100 % mit einem AS-Abschnitt eines *Aspergillus spp.* Proteins übereinstimmt, entstand zusätzlich die Hypothese, dass die AAK-Entwicklung in Verbindung mit einer vorangegangenen Aspergillus-Infektion steht [157]. Aufgrund der minimalen Prävalenz von anti-IFN- γ -AAk in gesunden Individuen und der hohen infektiologischen Anfälligkeit von Trägern dieser AAK [158] werden anti-IFN- γ -AAk als eine annähernd 100%ige Phänokopie der korrespondierenden Rezeptordefekte bzw. Produktions- und Signalwegdefekte angesehen.

5.3.2.3. AAK gegen IL-17A, IL-17F und IL-22

Die Zytokine IL-17A, IL-17F sowie IL-22 führen zur Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs. Zusätzlich fördern sie die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen und regulieren die Produktion von antimikrobiell-wirkenden Peptiden (z.B. Defensin) zur Aufrechterhaltung der Hautschutzbarriere gegenüber Pilzinfektionen. Sie werden hauptsächlich durch TH₁₇-Zellen exprimiert, können aber auch von NK-Zellen gebildet werden [159]. Eine PID-beeinträchtigte IL-17-Signalkaskade (Gene *IL17F*, *IL17RA*) bzw. Produktion / Funktionalität von TH₁₇-Zellen (Gene *IL12B*, *IL12RB1*, *STAT3*, *STAT1*, *DOCK8*) kann zur Ausprägung einer chronischen mukokutanen Candidiasis (CMC) [160-162] führen. Dieses Krankheitsbild wurde vermehrt in Patienten mit einem autoimmunen polyendokrinen Syndrom Typ 1 (APS-1) / *autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy* (APECED)-Syndrom und Thymomen beobachtet. In beiden Populationen besteht eine erhöhte AAK-Prävalenz (> 90 %) gegen IL-17A, IL-17F und IL-22, so dass AAK gegen IL-17 als Phänokopie der korrespondierenden Rezeptordefekte bzw. Produktions- und Signalwegdefekte aufgefasst werden [163, 164].

5.3.2.4. AAK gegen IL-6

IL-6 ist aufgrund seiner anti- sowie pro-inflammatorischen Eigenschaften und der damit verbundenen Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen anti- und pro-inflammatorischen Signalen ein essentieller Regulator der Immunantwort [165]. Patienten, die aufgrund eines PIDs innerhalb des IL-6-bildenden Signalwegs (*MYD88*, *IRAK4*, *IKBKG* oder *NFKBIA*) [108, 110, 111, 166] eine fehlende oder verminderte IL-6-Produktion aufweisen, leiden vornehmlich an schweren invasiven Infektionen, wie einer Meningitis, Sepsis oder Arthritis [112]. Patienten mit einer Mutation im Bereich des IL-6-vermittelten Signalwegs, wie im Rezeptor IL-6R (*IL6R*) [167, 168], der Rezeptoruntereinheit gp130 (*IL6ST*) [169] oder in den Transkriptionsfaktoren ZNF341 (*ZNF341*) [170] und STAT3 (*STAT3*) [106, 107], erkrankten hingegen an schweren Pneumonien bzw. bakteriellen Hautinfektionen. Der letztere Phänotyp konnte ebenfalls bei Patienten mit inhibierend-wirkenden anti-IL-6-AAk beobachtet werden [114, 115]. Der erste beschriebene anti-IL-6-AAk-positive Patient erkrankte im Alter von 11 Monaten bzw. 2 ⁵/₁₂ Jahren an schweren Hautinfektionen durch *Staphylococcus aureus*. Trotz Fieber (39 °C) und erhöhtem Procalcitonin (2 ng/ml) präsentierte er einen normalen CrP-Spiegel (< 5 mg/l) [114]. Die zwei folgenden Fälle umfassten einen 67 Jahre alten Mann mit bakteriellem Empyem (*Escherichia coli*, *Staphylococcus intermedius*) im Bereich des Brustkorbs sowie eine 56 Jahre alte Frau mit multiplen subkutanen Abszessen (*S. aureus*). Beide präsentierten trotz schwerer Infektionen keinen CrP-Anstieg. Nach einer vergeblichen Suche nach einem PID wurden in beiden Patienten anti-IL-6-AAk detektiert [115]. Bereits im Jahr 1996 wurden AAK gegen IL-6 bei Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose beschrieben und die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei anti-IL-6-AAk um einen Faktor für ein erhöhtes Infektionsrisiko handeln könnte. Eine Analyse der *in vitro* Neutralisierung von IL-6 durch anti-IL-6-AAk erfolgte zum damaligen Zeitpunkt jedoch nicht [171]. Anhand dieser Beobachtungen wurden AAK gegen IL-6 als potentielle Phänokopien von angeborenen ID mit verminderter IL-6-Produktion (*MYD88*, *IRAK4*, *IKBKG*, *NFKBIA*) und verminderter Signaltransduktion (*IL6R*, *IL6ST*, *STAT3*, *ZNF341*) angesehen. Wegen der bisher niedrigen Fallzahlen blieb ihre Rolle für eine erhöhte Infektionsanfälligkeit aber unklar.

5.4. Zielsetzung

Angeborene ID und deren Phänokopien führen bei betroffenen Patienten zu einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität. Die vorliegende Arbeit bearbeitet die immunologische und klinische Variabilität von Patienten mit NEMO-Defekten und beschreibt erstmalig anhand der Analyse von großen Patientenkohorten den immunologischen und klinischen Phänotyp von anti-IL-6-AAk.

Hypomorphe NEMO-Defekte verursachen bei männlichen, hemizygoten Trägern sehr unterschiedliche Erkrankungen: keine bis schwere EDA, ID, EDA-ID, EDA-ID-L, EDA-ID-O oder EDA-ID-OL. Die Ausprägung der ID variiert dabei stark. Sie können jenseits der Pubertät mit einer sehr geringen pathologischen Infektionsanfälligkeit einhergehen bzw. ohne HSZT nicht mit dem Überleben vereinbar sein. Entsprechend unterschiedlich fällt auch der immunologische Phänotyp dieser Erkrankungen aus. In der vorliegenden Arbeit wurde der immunologische und klinische Phänotyp einer bisher unbekannten *IKBKG*-Mutation beschrieben. Der detaillierte Vergleich mit drei weiteren Patienten mit NEMO-Defekt, die an der Kinderklinik der Charité behandelt werden, sowie mit allen publizierten Patienten sollte dabei klären, ob der immunologische Phänotyp eine frühzeitige Abschätzung der individuellen Prognose des Patienten ermöglicht [1].

Anti-IL-6-AAk werden zu den Phänokopien angeborener ID gezählt [172]. Das Ausmaß der Prädisposition für schwere Infektionen ist jedoch aufgrund der geringen Zahl vorbeschriebener Patienten ($n = 3$) bisher unklar [114, 115]. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig Prävalenzanalysen für *in vitro* neutralisierende anti-IL-6-AAk in drei großen Patientenkohorten mit 1) bakteriellen Infektionen, 2) mykobakteriellen Infektionen und 3) Autoimmunerkrankungen sowie in drei großen Kontrollkohorten ohne bisherige schwere bakterielle Infektionen durchgeführt. Dabei wurden die folgenden Hypothesen geprüft:

- Die Prävalenz von anti-IL-6-AAk ist in einer Patientenkohorte mit bakteriellen Infektionen höher als in Kohorten mit gesunden Individuen.
- Die Prävalenz von anti-IL-6-AAk ist in einer Patientenkohorte mit bakteriellen Infektionen höher als in einer Kohorte mit mykobakteriellen Infektionen.
- Anti-IL-6-AAk von Patienten mit bakteriellen Infektionen sind spezifisch für IL-6 und neutralisieren die Wirkung von IL-6 *in vitro*.
- Neutralisierende anti-IL-6-AAk von Patienten mit bakteriellen Infektionen unterbinden den klassisch- und trans-vermittelten IL-6-Signalweg.
- Neutralisierende anti-IL-6-AAk von Patienten mit bakteriellen Infektionen erkennen spezifische IL-6-Epitope, die für die Bildung des di-heterotrimeren IL-6-Signalkomplexes essentiell sind.

6. Material & Methoden

6.1. Material

6.1.1. Zelllinien

Tabelle 1. Übersicht Zelllinien

	Zelltyp	Herkunft	Verwendung
P1A_m	Primäre Fibroblasten	Isolation aus Hautstanze	Stimulation
P1A_m	SV40 Fibroblasten	Transfektion primärer Fibroblasten mit Vektor pLAS-wt	Anti-IL-6-ELISA Western Blot
Ba/F3-gp130 Ba/F3-gp130/IL-6R	Murine pro-B-Zelllinie	Transfektion muriner pro-B-Zellen mit humanem gp130 und IL-6R	Klassischer und trans IL-6-Signalweg

ELISA, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*; gp130, Glykoprotein 130; IL-6R, IL-6-Rezeptor; m, männlich; P, Patient; SV40, Simian-Virus 40

6.1.2. Enzyme

Collagenase TYP III, CLS III	Merck (Biochrom GmbH), Darmstadt, DEU
GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μL)	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen™), Waltham, USA
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNase H (<i>E. coli</i>)	Episentre (Illumina), Madison, USA
RNasin® Ribonuclease Inhibitors	Promega, Madison, USA

6.1.3. Plasmide

pLAS-wt	Eukaryotischer Expressionsvektor inklusive großem T-Antigen des Simianen-Virus 40 (Größe 7,4 kb), Ampicillin-resistent [173]
---------	---

6.1.4. Antikörper

CD3 FITC, IgG ₁ κ mouse, (Clone SK7)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD3-APC-AF750, IgG ₁ κ mouse (Clone UCHT1)	Beckman Coulter, Brea, USA
CD4-PB, IOTest, IgG ₁ mouse (Clone 13B8.2)	Beckman Coulter, Brea, USA
CD8-APC, IOTest [®] , IgG ₁ mouse (Clone B 9.11)	Beckman Coulter, Brea, USA
CD14 Pe-Cy [™] 7, IgG _{2a} mouse (Clone M5E2)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD14-ECD, IOTest [®] , IgG _{2a} mouse (Clone RMO52)	Beckman Coulter, Brea, USA
CD16-PE, IOTest [®] , IgG ₁ mouse (Clone 3G8)	Beckman Coulter, Brea, USA
CD19 APC, IgG ₁ mouse (Clone SJ25C1)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD19-PC5.5, IOTest [®] , IgG ₁ mouse (Clone J3-119)	Beckman Coulter, Brea, USA
CD45-KrOr [™] , IOTest [®] , IgG ₁ mouse, (Clone J.33)	Beckman Coulter, Brea, USA
CD56-PE, IOTest [®] , IgG ₁ mouse (Clone NKH-1)	Beckman Coulter, Brea, USA
CD56-ECD, IOTest [®] , IgG ₁ mouse (Clone NKH-1)	Beckman Coulter, Brea, USA
IkBα, polyclonal IgG rabbit, (C-21)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
IKKγ / NEMO, IgG ₁ mouse, (Clone 54/IKKγ/NEMO)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
IKKγ / NEMO-PE, IgG ₁ mouse, (Clone 54)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
IKKγ / NEMO, rabbit, monoclonal, (EPR14660)	Abcam, Cambridge, GB
IKKγ / NEMO, rabbit, polyclonal, (SAB3500414)	Merck (Sigma Aldrich [®]), Darmstadt, DEU
GAPDH, polyclonal IgG rabbit (FL-335)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Goat anti-mouse IgG-HRP	Dianova, Hamburg, DEU
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Dianova, Hamburg, DEU
Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7) XP [®]	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
IgG rabbit mAb (AF488)	
STAR106P-HRP, polyclonal IgG goat	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Streptavidin-HRP	BioLegend, San Diego, USA

6.1.5. Oligonukleotide

Tabelle 2. GoTaq-PCR (Firma TIB Molbiol, Berlin, DEU)

Primer	Orientierung	Sequenz	Produkt [bp]	Verwendung
<i>IKBKG</i>	FWD	CAGCTGGAGCAGCTGCAGAG	1050	GoTaq-PCR
	REV	GCAGCGAGTCAGGCCTGATC		

bp, Basenpaar; FWD, *Forward*; PCR, *Polymerase chain reaction*; REV, *Reverse*

Tabelle 3. cDNA-Synthese (Firma Invitrogen, Carlsbad, USA)

Primer	Sequenz [5'→3']	Produkt [bp]	Verwendung
Oligo (dT) 12-18	TTTTTTTTTTTTTTTTT	-	cDNA-Synthese

bp, Basenpaar; cDNA, *Complementary DNA*

Tabelle 4. RT-PCR (Firma TIB Molbiol, Berlin, DEU)

Primer	Orientierung	Sequenz [5'→3']	Produkt [bp]	Verwendung
IKBKG	FWD	GGCCCTACCAGCGTTCACAGTC	1568	RT-PCR
	REV	GCAGCGAGTCAGGCCTGATC		

bp, Basenpaar; FWD, *Forward*; PCR, *Polymerase chain reaction*; REV, *Reverse*; RT, *Reverse Transkriptase*

Tabelle 5. Long-range PCR (IKBKG-spezifisches Amplifikat auf NG_009896.1)

Primer	Orientierung	Sequenz [5'→3']	Produkt [bp]	Verwendung
IKBKG	FWD	GCAGATCAGGACGTACTGGGCG	12479	Long-range-PCR
	REV	GGCTAGGCAGGCGGGAGAGG		

bp, Basenpaar; FWD, *Forward*; PCR, *Polymerase chain reaction*; REV, *Reverse*

6.1.6. Reagenzien

Acrylamide / Bis Solution, 30 %, 29:1	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA DEU
Agarose (DNA-Elektrophorese)	Serva, Heidelberg, DEU
Ammoniumpersulfat	Merck (Sigma Aldrich®), Darmstadt, DEU
Amphotericin B	PAN Biotech, Aidenbach, DEU
BD FACS Flow™	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
BD FACS™ Shutdown Solution	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Biocoll-Trennlösung (1,077 g/ml)	Merck (Biochrom GmbH), Darmstadt, DEU
Bovines Serumalbumin (BSA)	BIOMOL International, Great Lakes, USA
cOmplete™, Mini, EDTA-free	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CHE
dNTP-Mix 10 mM	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen™), Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Sigma Aldrich®), Darmstadt, DEU
Dithiothreitol (DTT), 0,1 M Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DNA Gel Loading Dye (6 x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

ECL Western Blotting Substrate	Promega, Madison, USA
Enzyme Stopping Solution (0,5 M H ₂ SO ₄)	Qiagen (Cellestis), Hilden, DEU
Enzyme Substrate Solution	Qiagen (Cellestis), Hilden, DEU
Ethanol (absolut)	Thermo Fisher Scientific (J.T. Baker), Waltham, USA
Ethidiumbromid-Lösung 1 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Fötale Kälberserum (FCS)	Merck (Biochrom GmbH), Darmstadt, DEU
Fresenius Kabi Ampuwa Wasser	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, DEU
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Immulite® 1000, IL-6	Siemens, München, DEU
Immulite® 1000, IL-10	Siemens, München, DEU
Ionomycin (<i>Streptomyces conglobatus</i>)	Merck (Sigma Aldrich®), Darmstadt, DEU
Laemmli Sample Buffer 2 x	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Lipopolysaccharides (<i>S. enterica</i> serotype minnesota Re 595)	Merck (Sigma Aldrich®), Darmstadt, DEU
Magermilchpulver	Merck (Sigma Aldrich®), Darmstadt, DEU
Magnesium Chloride Solution, 25 mM	Promega, Madison, USA
2-Mercaptoethanol	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Methanol, BAKER ANALYZED® ACS	Thermo Fisher Scientific (J.T. Baker), Waltham, USA
Myco-3	AppliChem, Darmstadt, DEU
Penicillin / Streptomycin	Merck (Biochrom GmbH), Darmstadt, DEU
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat	Merck (Sigma Aldrich®), Darmstadt, DEU
Precision Plus Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Recombinant Human IL-1β/IL-1F2 Protein	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rekombinantes murines IL-3 (<i>E. coli</i>)	Peprotech, Rocky Hill, USA
Rekombinantes humanes IL-6 (CF)	BioLegend, San Diego, USA
Rekombinantes humanes IL-6R α Protein, CF	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rekombinantes humanes IL-10 (<i>E. coli</i>)	Peprotech, Rocky Hill, USA
Recombinant Human TNF-α Protein	R&D Systems, Minneapolis, USA
Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RoActemra® (Tocilizumab)	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CHE
RT-PCR Grade Water	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Temed	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Tris Base	Merck (Sigma Aldrich®), Darmstadt, DEU
Trypanblau-Lösung	Merck (Sigma Aldrich®), Darmstadt, DEU
Trypsin / EDTA-Lösung	Merck (Biochrom GmbH), Darmstadt, DEU

6.1.7. Kits

GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Human IgG Subclass Kit	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DEU
Human sgp130 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
PeliPair™ reagent set (IL-6)	Sanquin, Amsterdam, NL
PerFix EXPOSE Kit	Beckman Coulter, Brea, USA
PerFix-nc Kit	Beckman Coulter, Brea, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, DEU
QIAshredder™ Säulen	Qiagen, Hilden, DEU
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega, Madison, USA
Xfect Transfection Reagent	TAKARA Bio Inc. (Clontech), Kusatsu, J

6.1.8. Medium

AIM-V® Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
AmnioMAX C-100 Basal Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
AmnioMAX C-100 Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMEM-Medium, GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX-I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
VLE-RPMI 1640 (very low endotoxin)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

6.1.9. Puffer (kommerziell)

PBS-Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Merck (Biochrom GmbH), Darmstadt, DEU
Fixation buffer (BD Cytofix™)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Green Diluent Buffer	Qiagen (Cellestis), Hilden, DEU

Green GoTaq® Flexi Buffer 5 x	Promega, Madison, USA
Perm III Puffer (BD Phosflow™)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Phusion HF Buffer 5 x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TAE-Puffer 50 x (Tris-Acetat-EDTA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Waschpuffer 20 x	Qiagen (Cellestis), Hilden, DEU

6.1.10. Pufferzusammenstellung

Tabelle 6. Zusammensetzung Puffer

Puffer	Bestandteil	Verwendung
Coating-Puffer pH 9,6	0,1 M Karbonat/Bikarbonatpuffer	ELISA
Lysepuffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0,5 % Triton X (inklusive 1 x Protease-Inhibitor)	Zell-Lysat
SDS-Gel Puffer pH 8,8	1,5 M Tris 0,4 % SDS	Gelelektrophorese
SDS-Gel Puffer pH 6,8	0,5 M Tris 0,4 % SDS	Gelelektrophorese
10 x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 0,19 M Glycin 0,1 % SDS	Gelelektrophorese
10 x TBS-Puffer pH 7,5	0,02 M Tris 0,15 M NaCl	Westernblot
10 x TBST-Puffer pH 7,5	0,02 M Tris 0,15 M NaCl 0,05 % Tween 20	Westernblot
Transferpuffer	0,02 M Tris 0,19 M Glycin 20 % Methanol	Westernblot

6.1.11. Verbrauchsmaterial

BD Falcon 15 ml	Corning (Falcon), Corning, USA
BD Falcon 50 ml	Corning (Falcon), Corning, USA
Biosphere® Filter Tip 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Biosphere® Filter Tip 100 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Biosphere® Filter Tip 1250 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Biosphere Safe Seal Tube 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Biosphere Safe Seal Tube 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DEU

Biosphere Safe Seal Tube 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
CELLSTAR [®] Cell Culture Tubes	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT
Falcon [™] Rundboden-Polystyrolröhrchen	Corning (Falcon), Corning, USA
Nunc-Immuno [™] MicroWell [™] 96-Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Platte Gewebekultur, 6-Well	Corning (Falcon), Corning, USA
Platte Gewebekultur, 48-Well	Corning (Falcon), Corning, USA
Serologische Pipette 5 ml	Corning (Falcon), Corning, USA
Serologische Pipette 10 ml	Corning (Falcon), Corning, USA
Serologische Pipette 25 ml	Corning (Falcon), Corning, USA
Transferpipetten (steril)	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Whatman [™] Blotting-Papier Sorte GB005	GE Healthcare, Chicago, USA
Whatman [™] Protran [™] BA85 Nitrocellulose	GE Healthcare, Chicago, USA
Zellkulturflaschen, Nunc [™] EasYFlask [™] , 25 cm ²	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellkulturflasche, 75 cm ²	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT
Zellkulturschale, Falcon [®] 100 mm	Corning (Falcon), Corning, USA
Zellschaber, 25 mm	Sarstedt, Nümbrecht, DEU

6.1.12. Geräte

BD FACS Canto II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Biometra T-Personal Thermal Cycler	Analytik Jena AG, Jena, DEU
Bio Rad Mini Protean [®] 3 cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Brand [™] Neubauer Zählkammern	BRAND GmbH + Co KG, Wertheim, DEU
ChemiDoc [™] MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Consort E835 Powersupply	Merck (Sigma Aldrich [®]), Darmstadt, DEU
Decon DC Science TEC Transilluminator	Decon DC Science Tec, -, -
Eppendorf Research Pipette 1-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Eppendorf Research Pipette 2-20 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Eppendorf Research Pipette 20-200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Eppendorf Research Pipette 10-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Eppendorf Research Pipette 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
FLUOstar OPTIMA Microplate Reader	BMG Labtech, Ortenberg, DEU
HeraCell CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Immulite [®] 1000	Siemens, München, DEU
Mikrozentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Mikroskop Typ 11307072057	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, DEU
Nalgene [™] Cryo 1 °C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific (Nalgene), Waltham, USA

NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Navios 3L 10C	Beckman Coulter, Brea, USA
PeqStar Thermozykler	VWR (Peqlab), Radnor, USA
Pipettierhelfer accu-jet [®] pro	BRAND GmbH + Co KG, Wertheim, DEU
Power Pac [™] Basic	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Power Pack P25T Biometra	Analytik Jena AG, Jena, DEU
Trans Blot [®] SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Sicherheitswerkbank Heraeus [®]	Heraeus Group, Hanau, DEU
Titramax 101	Heidolph, Schwabach, DEU
TS-100 Thermo Shaker	Lab4you, San Francisco, USA
VersaMax [™] Microplate Reader	Molecular Devices, San José, USA
Wasserbad GFL [®] 1086	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, DEU
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, DEU

6.1.13. Software

BD FACSDiva [™] Software v 6.1.3	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Clustal Omega, EMBL-EBI (<i>open-source</i>)	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
DE Vision G 2.1 Software	Decon DC Science Tec, -, -
EMBOSS Transeq, EMBL-EBI (<i>open-source</i>)	https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/
ENSEMBL (<i>open-source</i>)	https://www.ensembl.org/index.html
ExAC Browser (<i>open-source</i>)	http://exac.broadinstitute.org Exom-Sequenzierung von 60706 Individuen, Exome Aggregation Consortium [174]
FlowJo v 8.8.6	BD Biosciences (FlowJo [™] LLC), Franklin Lakes, USA
GraphPad Prism v 5.01	GraphPad Software Inc, San Diego, USA
Image Lab Software 5.2.1	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Navios Software v 2.1.	Beckman Coulter, Brea, USA
ND-1000 v 3.8.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Optima Software v 2.20R2	BMG Labtech, Ortenberg, DEU
Primer Design Tool (<i>open-source</i>)	https://www.science.co.il/biomedical/software/Primer-tools.php
Protein Data Bank, EMBL-EBI (<i>open-source</i>)	http://www.ebi.ac.uk/pdbe/
Reverse Complement (<i>open-source</i>)	https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
SoftMax Pro 6.2.2	Molecular Devices LLC, San José, USA

6.2. Methoden

6.2.1. Isolation und Immortalisierung von humanen Fibroblasten

6.2.1.1. Isolation von primären Fibroblasten

Fibroblasten sind im Bindegewebe lokalisierte Zellen, die durch die Produktion von Strukturproteinen und Zytokinen eine wichtige Rolle innerhalb der Wundheilung spielen. Für die Zellisolation wurde eine Hautstanze (Durchmesser von 2 x 2 bzw. 4 x 4 mm, Tiefe 5-10 mm) verwendet. Das gewonnene Material aus oberflächlicher Haut und subkutanem Bindegewebe wurde in RPMI-Medium (37 °C) gewaschen und mit einem Skalpell zerkleinert. Um die Fibroblasten aus der Dermis zu gewinnen, folgte ein Verdau mit 2 ml Kollagenase über 1,5 h bei 37 °C. Anschließend wurde das Material 2 x in 5 ml RPMI-Medium gewaschen (10 min, 450 x g) und in 5 ml AmnioMAX™ C-100 Basal Medium inklusive AmnioMAX™ C-100 Supplement aufgenommen. Die Suspension wurde bei 37 °C inkubiert und auf konfluent-wachsende Zellen kontrolliert.

6.2.1.2. Stabile Transfektion von primären Fibroblasten

Primäre Fibroblasten verfügen nur über eine begrenzte Lebensspanne und sterben nach ca. 15-20 Passagen. Um Fibroblasten dauerhaft nutzen zu können, bedarf es einer Immortalisierung. Diese erfolgte durch eine stabile Transfektion mit Hilfe des Transfektionspolymers Xfect™ von der Firma Clontech. Der Ansatz wurde mit 2,5 µg Plasmid-DNA (pLAS-wt mit großem T-Antigen des Simian-Virus 40, SV40) nach Herstellerangaben in einer 6-Well-Platte pipettiert. Die Zellen wurden anschließend in DMEM-GlutaMax-Medium (inklusive 10 % inaktiviertes FCS sowie 1 % Penicillin / Streptomycin) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei einer Konfluenz von 100 % wurden die Zellen solange passagiert bis keine zelluläre Kontaktinhibition mehr vorlag und sich vielschichtige Zellansammlungen, sogenannte *Cluster*, bildeten.

6.2.2. Stimulation von SV40-immortalisierten Fibroblasten

6.2.2.1. Nachweis von IL-6 im Zellüberstand nach Stimulation

Die Aussaat der SV40-Fibroblasten erfolgte 24 h vor Stimulation in einer 6-Well-Platte (DMEM-GlutaMax inklusive 10 % inaktiviertes FCS und 1 x Myco-3). Pro Well wurden 2 ml Zellsuspension (1×10^5 Zellen/ml) vorgelegt und die Konfluenz am Folgetag kontrolliert. Das Medium wurde verworfen und die Zellen für 24 h mit IL-1 β (20 ng/ml), TNF- α (20 ng/ml) und PMA / Ionomycin (1×10^{-7} M / 1×10^{-5} M) stimuliert. Die IL-6-Konzentration im Überstand wurde mittels anti-IL-6-ELISA bestimmt.

6.2.2.2. Anti-IL-6-Sandwich-ELISA

Die IL-6-Detektion wurde mit dem PeliPair™ humanen IL-6 (hIL-6) ELISA Kit von der Firma Sanquin durchgeführt. Zu Beginn erfolgte die Plattenbeschichtung (96-Well MaxiSorp®) mit einem 1:100 verdünnten anti-IL-6-Ak (0,1 M Karbonat / Bikarbonat-Puffer, pH 9,6). Dabei wurden 50 µl/Well aufgetragen und die Platte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit einem 5 % BSA/PBS-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur geblockt und 3 x mit Waschpuffer (1 x) gewaschen. Danach wurden jeweils 50 µl unverdünnter sowie verdünnter (1:10 in 1 % BSA/PBS-Puffer) Zellüberstand pro Well aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur (schüttelnd) inkubiert. Nachdem die Platte 6 x mit Waschpuffer (1 x) gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit einem zweiten anti-IL-6-Ak (1:100 in 1 % BSA/PBS-Puffer) für 2 h bei Raumtemperatur (schüttelnd). Es folgte ein erneuter Waschschrift (6 x mit Waschpuffer) sowie die Bindung des Streptavidin-HRP Konjugats (1:8.000 in QFT-Puffer) an den Antikörperkomplex (2 h bei Raumtemperatur, schüttelnd). Die Platte wurde 6 x gewaschen (Waschpuffer, 1 x) und 100 µl TMB-Substrat/Well aufgetragen. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit einer 0,5 M Schwefelsäure-Lösung gestoppt und die Platte bei einer Wellenlänge von 450/540 nm gemessen (SoftMax Pro 6.2.2).

6.2.2.3. Nachweis von IκBα in Zelllysaten nach Stimulation

Die Aussaat von SV40-Fibroblasten erfolgte 24 h vor Stimulation in einer 10 cm Petrischale (DMEM-GlutaMax inklusive 10 % inaktiviertes FCS und 1 x Myco-3). Dabei wurde das individuelle Wachstumsverhalten der einzelnen Zelllinien berücksichtigt, um eine gleiche Konfluenz am darauffolgenden Tag zu erhalten (> 80 %). Die Stimulation erfolgte für 0, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 min mit IL-1β (10 ng/ml) bzw. TNF-α (20 ng/ml). Danach wurden die Petrischalen auf Eis überführt, das Medium verworfen und die Zellen mit eiskaltem 1 x PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden erneut mit 5 ml kaltem 1 x PBS-Puffer überschichtet und mit Hilfe eines Zellschabers von der Schale gelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 4 °C zentrifugiert (5 min, 450 x g). Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 30 µl Lysepuffer (inklusive 1 x Protease-Inhibitor) aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurde dieses für 5 min bei 4 °C (800 x g) zentrifugiert und der erhaltene Proteinüberstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben. Die Verdünnung des Standards sowie der einzelnen Proben (1:5) erfolgte in 1 x PBS-Puffer. Die Messung und Auswertung der Konzentration erfolgten mit Hilfe des FLUOstar OPTIMA Readers und unter Anwendung der Optima Software v 2.20R2.

6.2.2.4. SDS-Gelelektrophorese und Westernblot

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach ihrer Molekülgröße mit Hilfe eines 10%igen Polyacrylamidgels (Tabelle 7).

Tabelle 7. Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels

Trenngel	
Wasser	8,25 ml
Puffer pH 8,8	5 ml
Acrylamid / Bisacrylamid 30 %	6,8 ml
Ammoniumpersulfat-Lösung 10 %	150 µl
Temed	15 µl
Sammelgel	
Wasser	6,5 ml
Puffer pH 6,8	2,5 ml
Acrylamid / Bisacrylamid 30 %	1 ml
Ammoniumpersulfat-Lösung 10 %	100 µl
Temed	20 µl

Als Laufpuffer wurde eine 1 x SDS-Pufferlösung verwendet. Die Proben (jeweils 30 µg) wurden mit 5 µl Laemmli-Probenpuffer (inklusive Mercaptoethanol) versehen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Vom Marker (*Precision Plus Dual Color Standard*) wurden 10 µl eingesetzt. Zu Beginn der Probenmigration wurde eine niedrige Spannung von 70 V (20 min) gewählt, die finale Separation erfolgte bei 100 V (60 min). Für den anschließenden Proteintransfer wurde eine Nitrozellulosemembran verwendet. Die Proteinübertragung erfolgte im Semi-Dry-Blot-Verfahren (60 min, 25 V). Die Membran wurde danach 3 x in 1 x TBST-Puffer gewaschen und für 60 min mit einer 5 % Milchpulver-TBST-Pufferlösung geblockt. Der primäre Ak wurden in einer 5 % Milchpulver-TBST-Pufferlösung verdünnt (Tabelle 8) und die Membran über Nacht (4 °C) schwenkend inkubiert. Danach wurde die Membran erneut 3 x in 1 x TBST-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Ak erfolgte für 60 min (4 °C) schwenkend. Die Membran wurde anschließend 4 x in 1 x TBST-Puffer gewaschen und die Protein-Ak-Komplexe mit den Western Lightning Plus – ECL Reagenzien (*Enhanced Luminol Reagent Plus* und *Oxidizing Reagent Plus*) detektiert. Die Analyse erfolgte am ChemiDoc MP Imaging System (ImageLab Software 5.2.1.). Das darauffolgende Ablösen des Ak-Komplexes zwecks Wiederverwendung der Membran erfolgte mit dem *Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer* (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben.

Tabelle 8. Westernblot-Antikörper

Primärer AK	Verdünnung	Sekundärer AK	Verdünnung
I κ B α	1:250	<i>Goat anti-rabbit IgG</i>	1:10000
GAPDH	1:1000	<i>Goat anti-rabbit IgG</i>	
Anti-IKK γ (NEMO) _{CC1-CC2}	1:5000	<i>Goat anti-rabbit IgG</i>	
Anti-IKK γ (NEMO) _{CC2-LZ}	1:1000	<i>Goat anti-mouse IgG</i>	
Anti-IKK γ (NEMO) _{ZF}	1:2000	<i>Goat anti-rabbit IgG</i>	

GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; I κ B α , NF- κ B Inhibitor α ; NEMO, NF- κ B essential modulator

6.2.3. Analyse von Patienten mit Verdacht auf einen PID

6.2.3.1. Nachweis von IL-6 und IL-10

Der Nachweis von IL-6 und IL-10 erfolgte im Labor des Fachbereichs Immunologie (Labor Berlin - Charité Vivantes GmbH, Berlin) unter der Leitung von Herrn Dr. C. Meisel. Für die Stimulation wurde Vollblut (Patient, gesunde Tageskontrolle und Reisekontrolle → Vollblut eines gesunden Spenders, das zeitgleich mit der Patientenprobe versendet wurde) mit RPMI-Medium in einem Verhältnis von 1:1 vermischt und in eine 48-Well-Platte (450 μ l/Well) überführt. Danach erfolgte die Zugabe der jeweiligen Stimulantien: PAM₂CSK₄ (TLR2-Agonist, Endkonzentration 100 ng/ml), LPS (TLR4-Agonist, Endkonzentration 1 ng/ml), IL-1 β (Endkonzentration 20 ng/ml), TNF- α (Endkonzentration 20 ng/ml) und PMA / Ionomycin (10^{-7} M / 10^{-5} M). Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C wurden die Überstände abgenommen und die Konzentration von IL-6 und IL-10 am Immulite® 1000 bestimmt. Anschließend erfolgte ein Vergleich zu der gesunden Kontrollkohorte (GK, n = 179), die alle im Labor Berlin gemessenen gesunden Tageskontrollen beinhaltet.

6.2.3.2. Intrazelluläre NEMO-Färbung

Der Nachweis von NEMO erfolgte mit dem PerFix-nc Kit (Low-Fixierung-Prozedur) und wurde nach Herstellerangaben im diagnostischen Labor des Fachbereichs Immunologie (Labor Berlin - Charité Vivantes GmbH, Berlin) durchgeführt. Es wurden 50 μ l Nabelschnurblut bzw. Vollblut der Patienten eingesetzt und für die Oberflächenfärbung Ak gegen die Rezeptoren CD3 (FITC, UCHT1), CD8 (APC, 9.11), CD45 (Kr-Orange, J.33) und CD56 (ECD, NKH-1) verwendet. Die intrazelluläre Färbung mit dem PE-markierten anti-IKK γ (NEMO)-Ak bzw. der IgG₁- κ -mouse Isotypkontrolle (MOPC-21, BD Biosciences) erfolgte parallel zur Permeabilisierung.

6.2.3.3. DNA-Isolation aus SV40-immortalisierten Fibroblasten

Die DNA wurde mit Hilfe des *Wizard® Genomic DNA Purification Kits* aus SV40-immortalisierten Fibroblasten isoliert. Der Ansatz erfolgte nach Herstellerangaben. Die Konzentration wurde am NanoDrop ND-1000 (ND-1000 v 3.8.1) ermittelt.

6.2.3.4. GoTaq-PCR

Zur Charakterisierung und Amplifizierung individueller Genbereiche wurde eine PCR mit der GoTaq® G2 Flexi DNA-Polymerase gewählt. Pro Ansatz wurden 150 ng DNA, 10 µl 5 x GoTaq Flexi Puffer (grün), 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 0,4 µM Vorwärts-Primer, 0,4 µM Rückwärts-Primer (*IKBKG*) sowie 2,5 U Polymerase eingesetzt (Endvolumen 50 µl) und das folgende Programm verwendet (Tabelle 9).

Tabelle 9. GoTaq-PCR-Programm

	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95	5 min	1
Denaturierung	95	1 min	32
Annealing	65	45 sec	
Elongation	72	1 min 30 sec	
Finale Elongation	72	6 min	1
-	4	endlos	-

6.2.3.5. RNA-Isolation aus SV40-immortalisierten Fibroblasten

Die Isolation erfolgte mit dem Qiagen Rneasy Mini Kit (Qiagen) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrops ND-1000 (ND-1000 v 3.8.1) ermittelt.

6.2.3.6. cDNA-Synthese

Mittels reverser Transkriptase (RT) wurde ein cDNA-Strang aus zuvor isolierter RNA hergestellt. In einem Ansatz wurden 500 ng RNA (in einem Volumen von 10 µl) mit 1 µl Oligo (dT) 12-18 Primer (0,5 µg/µl) sowie 1 µl dNTP-Mix (10 mM) vermengt und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion auf Eis gekühlt und 4 µl 5 x Puffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl rekombinanter RNasin Ribonuklease Inhibitor (40 U/µl) sowie 1 µl M-MLV-RT (200 U/µl) zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 50 min bei 37 °C sowie eine Inaktivierung der reversen Transkriptase für 15 min bei 70 °C. Verbliebene nicht-umgeschriebene RNA wurde mittels Zugabe von 1 µl RNase H (2 U/µl) für 20 min bei 37 °C abgebaut.

6.2.3.7. RT-PCR

Für die RT-PCR wurden pro Ansatz 2 µl cDNA, 4 µl 5 x Phusion HF Puffer, 0,2 mM dNTP-Mix, 0,5 µM Vorwärts-Primer, 0,5 µM Rückwärts-Primer (*IKBK*G), 0,4 U Phusion DNA Polymerase und Wasser (Endvolumen 20 µl) eingesetzt und das folgende Programm verwendet (Tabelle 10).

Tabelle 10. RT-PCR Programm

	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Denaturierung	98	30 sec	1
Denaturierung	98	10 sec	30
Annealing	68	20 sec	
Elongation	72	30 sec	
Finale Elongation	72	7 min	1
-	4	endlos	-

6.2.3.8. DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1%igen Agarosegel auf Basis eines 1 x TAE-Puffers mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid. Als Größenstandard wurden 10 µl einer 1 kb DNA-Leiter (0,1 µg/µl, *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*) parallel zum PCR-Produkt aufgetragen. Bei der GoTaq-PCR handelte es sich dabei um ein Volumen von 25 µl (ohne zusätzlichen Ladepuffer) und bei der RT-PCR um ein Volumen von 24 µl inklusive 4 µl 6 x Ladepuffer (6 x *DNA Gel Loading Dye*). Die Elektrophorese wurde bei 85 V für 30 min durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Geldokumentationssystems Decon DC Science TEC Transilluminator und der Software DE Vision G 2.1.

6.2.3.9. Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Isolierung der im Agarosegel aufgetrennten DNA-Abschnitte erfolgte mit Hilfe des GeneJET Gel Extraction Kits nach Herstellerangaben. Dabei wurde das PCR-Produkt herausgeschnitten und das Gelstück für 10 min bei 60 °C erhitzt. Die Elution erfolgte in 50 µl Elutionspuffer. Die anschließende Sequenzierung (2 µM Primer/Sequenzierungsansatz) erfolgte bei der Microsynth SeqLab GmbH (Göttingen, Deutschland).

6.2.3.10. Isolation von mononukleären Zellen

Die Präparation von mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) aus heparinisiertem Vollblut erfolgte über einen Biocoll-Gradienten. Das Blut wurde zu Beginn mit 1 x PBS-Puffer 1:1 verdünnt und auf die Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml) geschichtet. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min bei 1000 x g (Raumtemperatur, ohne Bremse) zentrifugiert. Der entstandene PBMC-Zellring wurde mittels steriler Pasteurpipette abgenommen, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 1 x PBS-Puffer für 5 min bei 450 x g gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 x PBS-Puffer aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 450 x g). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml RPMI-Medium (inklusive 5 % inaktiviertes FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die gewonnenen PBMCs wurden entweder weggefroren (Einfriermedium: FCS inklusive 10 % DMSO) oder für folgende Stimulationsansätze auf die entsprechende Zellzahlkonzentration verdünnt.

6.2.4. Analyse von Patienten mit Verdacht auf neutralisierende anti-IL-6-AAk

6.2.4.1. Anti-IL-6-AAk-IgG-Sandwich-ELISA

Der Nachweis von spezifischen anti-IL-6-AAk erfolgte mit Hilfe des PeliPair™ hIL-6 ELISA Kits von der Firma Sanquin. Zu Beginn wurde die Platte (96-Well MaxiSorp®) mit einem anti-IL-6-Ak (50 µl/Well; 1:100 in einem 0,1 M Karbonat / Bikarbonat-Puffer, pH 9,6) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Platte mit einem 5 % BSA/PBS-Puffer geblockt (1 h, Raumtemperatur) und 3 x mit dem Waschpuffer (1 x) gewaschen. Anschließend wurde rekombinantes hIL-6 aufgetragen (Ursprung *E. coli*, 50 µl/Well; 1 µg/ml in 1 % BSA/PBS-Puffer) und für 2 h bei Raumtemperatur (schüttelnd) inkubiert. Die Platte wurde 6 x gewaschen und 100 µl/Well verdünntes Serum bzw. Plasma (1:100; 1:400, 1:1600 sowie 1:6400 in 1 % BSA/PBS-Puffer) aufgetragen (2 h, Raumtemperatur, schüttelnd). Um die Spezifität der AAK zu bestimmen wurde parallel ein zweiter Ansatz mit Serum- bzw. Plasma-Proben vorbereitet. Diese wurden mit 2,5 µg/ml rekombinanten hIL-6 vorinkubiert (1 h, Raumtemperatur, nicht schüttelnd) und mit den anderen Proben zeitgleich aufgetragen. Die Detektion von humanen anti-IL-6-AAk erfolgte mit Hilfe eines HRP-gelabelten *Goat-anti-human* IgG AKs (1:16.000 in *Green Diluent* Puffer) für 2 h bei Raumtemperatur (schüttelnd). Nach einem erneuten Waschschriff (9 x mit Waschpuffer) wurden 100 µl TMB-Substrat/Well aufgetragen und die Reaktion nach 15 min mit einer 0,5 M Schwefelsäure-Lösung gestoppt. Die optische Dichte (OD) wurde bei einer Wellenlänge von 450/540 nm bestimmt (SoftMax Pro 6.2.2).

6.2.4.2. Anti-IL-6-AAk-IgG-Subklassen-ELISA

Die Bestimmung der IgG-Subklassen erfolgte unter Anwendung des ELISA-Protokolls im Kapitel 6.2.4.1. Als Detektionsantikörper wurden HRP-markierte *Sheep anti-human IgG* Subklassen-Ak (IgG₁-IgG₄, jeweils 1:100 in 1 % BSA/PBS-Puffer) der Firma Biozol verwendet.

6.2.4.3. Cross-Over-Experiment

PBMCs eines gesunden Spenders sowie von P1 wurden auf eine Zellzahlkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml (VLE-RPMI 1640 Medium inklusive 10 % FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin) eingestellt und mit Serum von P1 bzw. des gesunden Spenders (finaler Anteil jeweils 20 %) versetzt. Die Stimulation erfolgte mit PAM₂CSK₄ (100 ng/ml), LPS (1 ng/ml) bzw. IL-1 β (20 ng/ml) für 48 h bei 37 °C in einer 48-Well-Platte (Endvolumen 500 μ l/Well). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die IL-6-Konzentration mittels Immulite[®] 1000 bestimmt.

6.2.4.4. Phosphorylierung von STAT3 in humanen CD4⁺ T-Zellen

Für den Stimulationsansatz wurde eine Zellzahlkonzentration von 5×10^6 PBMCs/ml (AIM-V-Medium inklusive anti-Fungi) gewählt und das Perfix Expose Kit verwendet. Das Serum wurde mit AIM-V-Medium auf 80 % verdünnt (finaler Anteil 20 %). Die Stimulation erfolgte mit rekombinantem hIL-6 (1 ng/ml sowie 10 ng/ml; *E. coli*) sowie mit rekombinantem hIL-10 (10 ng/ml). Zu Beginn wurde das gesunde Kontroll- bzw. Patientenmaterial mit den Stimulantien in einem Verhältnis von 1:1 vermengt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe der Zellsuspension (Verhältnis von 1:1, Endvolumen 100 μ l). Parallel dazu erfolgte ein Ansatz mit Tocilizumab, einem anti-IL-6R-Ak (100 μ g/ml in 80 % gesundem Spenderserum), bei dem die Zellen vor Zugabe der Stimulantien mit dem Ak für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Alle Ansätze wurden anschließend für 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Oberflächenfärbung erfolgte parallel dazu für 2 min und beinhaltete Ak gegen die Oberflächenrezeptoren CD3 (UCHT1), CD4 (13B8.2), CD14 (RMO52), CD16 (3G8), CD19 (J3-119) und CD56 (NKH-1). Die Zellen wurden daraufhin 10 min bei Raumtemperatur fixiert (25 μ l, im Dunkeln) und für 5 min bei 37 °C (Wasserbad) permeabilisiert (500 μ l FCS sowie 500 μ l Puffer 2). Die Ansätze wurden zentrifugiert (5 min, 400 x g) und der Überstand bis auf ein Restvolumen von 50 μ l verworfen. Das Zellpellet wurde in weiteren 50 μ l (Puffer 3) gelöst und es folgte die intrazelluläre pSTAT3-Färbung (AF488-markiert, 2 μ l/Ansatz) sowie die zusätzliche anti-CD45 Oberflächenfärbung (Kr-Orange; 4 μ l/Ansatz) für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nachdem 2 x mit 1 x Puffer 4 gewaschen und der Überstand verworfen wurde, erfolgten die Zellaufnahme in 200 μ l 1x PBS-Puffer und die Messung am Navios 3L 10C.

6.2.4.5. Phosphorylierung von STAT3 in murinen pro B-Zellen

Zur Analyse der beiden IL-6-Signalwege, klassisch sowie trans, wurden murine Ba/F3 Zellen verwendet, die zuvor mit den humanen Rezeptoren gp130 und IL-6R stabil transfiziert wurden (Ba/F3-gp130 und Ba/F3-gp130/IL-6R, zur Verfügung gestellt vom Institut für Biochemie, Christian-Albrechts-Universität Kiel (CAU), Leitung Prof. Dr. Stefan Rose-John). Die Zellen wurden in DMEM GlutaMax Medium (inklusive 10 % FCS, 60 mg/l Penicillin, 100 mg/l Streptomycin) kultiviert und benötigten einen Zusatz von murinem IL-3 (1 ng/ml). Für die Stimulation wurde eine Zellzahlkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml (AIM-V-Medium inklusive anti-Fungi) gewählt und das PerFix Expose Kit verwendet. Das Serum / Plasma der Patienten wurde mit AIM-V-Medium auf 20 % verdünnt (finaler Anteil 5 %) und zu Beginn mit rekombinantem hIL-6 (finale Konzentration 0,2, 1, 5, 25, 125 und 625 ng/ml) in einem Verhältnis von 1:1 vermengt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Analyse des trans Signalwegs erfolgte über die Ba/F3-gp130 Zellen und benötigte die Zugabe von rekombinantem sIL-6R (1000 ng/ml). Danach erfolgte die Zugabe der jeweiligen Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:1 (Endvolumen 100 µl). Parallel dazu wurden Ansätze mit Tocilizumab (100 µg/ml; anti-IL-6R-Ak) sowie einem kommerziellen anti-IL-6-Ak (1:100, Beschichtungsantikörper, siehe anti-IL-6-Sandwich-ELISA Kapitel 6.2.4.1) als negative Kontrollen eingesetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 37 °C wurden die Zellen fixiert (25 µl Fixierungspuffer; 10 min, Raumtemperatur) und permeabilisiert (500 µl FCS sowie 500 µl Puffer 2, 5 min, 37 °C). Alle Ansätze wurden zentrifugiert (5 min, 450 x g) und der Überstand bis auf ein Restvolumen von 50 µl verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl Puffer 3 inklusive pSTAT3-Ak (AF488-markiert, 2 µl/Ansatz) gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur (im Dunkeln) inkubiert. Danach folgte ein Waschschriff in 1 x Puffer 4 sowie die Aufnahme der Zellen in einem Volumen von 200 µl 1 x PBS-Puffer. Die Messung wurde am Navios 3L 10C durchgeführt.

6.2.4.6. Epitop-Mapping

Die Identifizierung der anti-IL-6-AAk-Bindungsstellen wurde in Kooperation mit dem Unternehmen JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin) unter Leitung von Herrn Ulf Reimer durchgeführt. Die verwendete Library umfasste 49 überlappende lineare IL-6 Peptide (Länge jeweils 15 AS), die auf einen Glaträger gespottet und mit dem Patientenmaterial (Serum bzw. Plasma, 1:200) inkubiert wurden. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Cy5-gelabelten sekundären murinen anti-human-IgG-Aks (Jackson Immuno Lab). Die Messung wurde mit dem Genepix 4200A Scanner unter Anwendung der GenePix (Version 7.0) Software durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Plattform R (Version 2.11.1, www.r-project.org). Das Epitop-Mapping der einzelnen anti-IL-6-AAk erfolgte in verschiedenen Ansätzen, sodass die Ergebnisse nur semi-quantitativ miteinander vergleichbar waren.

6.2.4.7. ELISA zum Nachweis der löslichen Rezeptoren sgp130 und sIL-6R

Die quantitative Bestimmung von sgp130 und sIL-6R α erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Biochemie (CAU) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Stefan Rose-John. Der Nachweis von sIL-6R erfolgte mit einem an der CAU-etablierten Sandwich-ELISA. Die Beschichtung der Platte erfolgte mit einem monoklonalen, anti-murinen-IL-6R-Ak. Anschließend wurden 100 μ l Serum bzw. Plasma aufgetragen und der Proteinkomplex mit einem biotinylierten *Goat-anti-mouse human* IL-6R-Ak detektiert. Die enzymatische Umsetzungsreaktion erfolgte durch HRP-gelabeltes Streptavidin und einer TMB-Lösung. Die Detektion von sgp130 wurde unter Anwendung des *DuoSet human gp130 ELISA Kits* (R&D Systems) nach Herstellerangaben durchgeführt.

6.2.4.8. Anti-Zytokin-AAk-Detektion mittels Multiplex-Analyse

Die Bestimmung weiterer anti-Zytokin-AAk erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Klinische Biochemie und Immunologie (Addenbrookes Hospital, Cambridge, Großbritannien) unter der Leitung von Herrn Dr. Rainer Döffinger. Auf einer Bead-basierten Multiplexebene wurden AAk gegen die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-23, IL-2, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α und GM-CSF detektiert [175]. Der Vergleich erfolgte zu einer Kontrollkohorte (n = 56). Die Analyse der Patienten P4 und P5 erfolgte in Kooperation mit dem *National Institute of Health* (NIH / NIAID, USA) unter der Leitung von Dr. Steven Holland und beinhaltete folgende Zytokine: IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ , GM-CSF, IL-1 α , IL-6, IL-12p70, IL-17A, IL-17F und IL-22. Der Vergleich erfolgte zu einem gesunden Kontrollindividuum (n = 1).

7. Ergebnisse

7.1. Einschätzung der klinischen Prognose anhand des immunologischen Phänotyps bei Patienten mit NEMO-Defekt - Männlicher Patient mit erstbeschriebener hemizygoter *IKBKG*-Mutation in Donor-Spleißstelle

7.1.1. Familienanamnese

In ihrer Kindheit präsentierte die Mutter des Patienten P1A_m aufgrund einer IP eine Pigmentstörung am ganzen Körper, sehr dünne Haare und konisch-geformte Milchzähne. Aktuell weist sie vereinzelt Pigmentflecken an den Waden und in den Kniekehlen auf, ihre Haare sind von normaler Dichte und das Gebiss ist nach dem Zahnwechsel, mit Ausnahme eines fehlenden Schneidezahns, normal entwickelt. Es wurde bei ihr eine X-chromosomale heterozygote Mutation in dem NEMO-kodierenden Gen *IKBKG* detektiert, bei der es sich um einen Basenaustausch von G zu A innerhalb der intronisch-liegenden Sequenz (*intervening sequence*, IVS) zwischen dem neunten und zehnten Exon (IVS9+1 G>A, Donor-Spleißstelle) handelt (Abbildung 5).

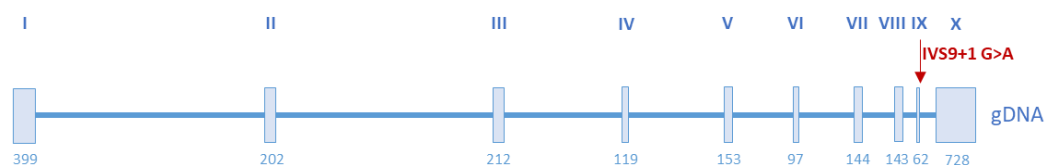


Abbildung 5. Schematische Darstellung von *IKBKG* mit Lokus der intronisch-liegenden Mutation IVS9+1 G>A. Unter Berücksichtigung der *IKBKG*-Transkriptionsvariante 1 (NM_001099857.2) sind die zehn Exons (I - X) auf genomischer DNA-Ebene (gDNA) in blau dargestellt. Die Position der Mutation IVS9+1 G>A wurde durch einen roten Pfeil markiert. DNA, Deoxyribonucleic acid; IVS, Intervening sequence.

Der Patient hat zwei ältere Schwestern, von denen die ältere keinen klinischen Phänotyp die jüngere eine IP aufweist. Nach Bekanntwerden einer erneuten Schwangerschaft mit einem männlichen Fötus und dem damit verbundenen Risiko, dass der männliche Nachkomme durch die X-chromosomale *IKBKG*-Mutation an einem NEMO-Defekt leiden könnte, erfolgte in der 18. Schwangerschaftswoche eine Amniozentese. Diese bestätigte eine hemizygote *IKBKG*-Mutation (IVS9+1 G>A) bei dem Patienten P1A_m (Abbildung 6).

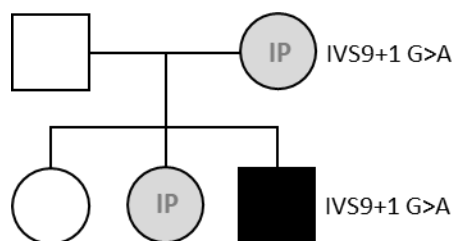


Abbildung 6. Stammbaum des Patienten P1A_m. Die Mutter weist aufgrund einer X-chromosomalen heterozygoten *IKBKG*-Mutation (IVS9+1 G>A) eine Incontinentia pigmenti (IP) auf (grau hinterlegt). Der Patient P1A_m (schwarz dargestellt) hat zwei ältere Schwestern, von denen das jüngere Mädchen ebenfalls Anzeichen einer IP zeigt. Eine genetische Untersuchung erfolgte bei ihr bisher nicht. Die hemizygoten Mutation bei P1A_m wurde pränatal mittels Amniozentese bestätigt. □, männlich; O, weiblich.

7.1.2. Immunologischer Phänotyp von P1A_m

Aufgrund der pränatal nachgewiesenen hemizygoten *IKBKG*-Mutation bei P1A_m wurde direkt nach der Geburt eine umfangreiche immunologische Untersuchung durchgeführt. Diese erfolgte im immundiagnostischen Labor des Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU, München) unter der Leitung von Herrn PD Dr. F. Hauck sowie im Labor des Fachbereichs Immunologie (Labor Berlin-Charité Vivantes GmbH, Berlin) unter der Leitung von Herrn Dr. C. Meisel.

7.1.2.1. Zelluläre Immunität von P1A_m

Die erste, orientierende Untersuchung des adaptiven Immunsystems beinhaltete die quantitative Bestimmung der T- und B-Zellen sowie der NK-Zellen im Nabelschnurblut. Die T- und B-Zellen des Patienten waren leicht erhöht (Tabelle 11).

Tabelle 11. Lymphozytenpopulation von P1A_m im Nabelschnurblut (LMU)

Zellpopulation		P1A_m [Zellen/ μ l]	Normbereich [Zellen/ μ l]
T-Zellen	CD3 ⁺	6986	600-5000
	CD4 ⁺	4531	400-3500
	CD8 ⁺	2643	200-1900
Ratio CD4/CD8		1,7	1,0-2,6
B-Zellen	CD19 ⁺	1794	40-1100
NK-Zellen		264	100-1900

CD, Cluster of differentiation; NK-Zelle, Natürliche Killerzelle

Bei Betrachtung der einzelnen T-Zellpopulationen lagen die kürzlich aus dem Thymus emigrierten T-Zellen (CD4⁺CD45⁺CD31⁺, *recent thymic emigrants*, RTE) im Normbereich. Der Patient wies jedoch eine stark verminderte Anzahl an Gedächtnis-T-Zellen (1 % CD4⁺CD45RO⁺ sowie 2 % CD8⁺CD45RO⁺) auf (Tabelle 12).

Tabelle 12. T-Zellpopulationen von P1A_m (LMU)

Naive / Gedächtnis-T-Zellen		P1A_m [%]	Normbereich [%] [176]
T-Helferzelle CD4 ⁺	CD45RA ⁺	98	59-100
	CD45RO ⁺	1	5-58
Zytotoxische T-Zellen CD8 ⁺	CD45RA ⁺	97	6-100
	CD45RO ⁺	2	0,22-100
RTE		P1A_m [%]	Normbereich [%] [176]
CD4 ⁺	CD45RA ⁺ CD31 ⁺	73,7	61-94
CD40L-positive T-Zellen		P1A_m [%]	Kontrolle [%]
CD4 ⁺	CD69 ⁺	98	86
	CD40L ⁺	92	82

CD, Cluster of differentiation; RTE, Recent thymic emigrants

Der Anteil der TZR-positiven, doppelt negativen T-Zellen war im Normbereich (Tabelle 13).

Tabelle 13. TZR-positive doppelt negative T-Zellen von P1A_m (LMU)

T-Zellen		P1A_m [%]	Normbereich [%]
CD4 ⁺ CD8 ⁻	$\gamma\delta^+$	1,6	< 4
	$\alpha\beta^+$	0,1	
CD8 ⁺	$\gamma\delta^+$	1	

CD, Cluster of differentiation

Die T-Zellproliferation wurde mit Hilfe eines intrazellulären CFSE (Carboxyfluoresceinsuccinimidylester)-Signals von sich teilenden Zellen [177] sowie einer quantitativen Zellzahlbestimmung nach Stimulation ermittelt. P1A_m wies eine verminderte Proliferationsrate nach Stimulation mit CD3 (12 % CD4⁺ sowie 13 % CD8⁺) und CD3/CD28 (53 % CD8⁺) auf (Tabelle 14). Der Einsatz von niedrig dosiertem PHA (Ratio 0,26) und OKT3 (Ratio 0,31) zeigte ebenfalls eine verminderte zelluläre Proliferation (Tabelle 15).

Tabelle 14. T-Zellproliferation von P1A_m (CFSE-Färbung, LMU)

T-Zellen	Stimulation	P1A_m [%]	Kontrolle [%]
CD4 ⁺	w/o	0,3	1
	PMA/I	97	86
	CD3	12	54
	CD3/CD28	80	80
CD8 ⁺	w/o	0	0
	PMA/I	96	87
	CD3	13	66
	CD3/CD28	53	81

CD, Cluster of differentiation; PMA/I, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat / Ionomycin; w/o, without

Tabelle 15. T-Zellproliferation von P1A_m nach Stimulation (LMU)

Stimulation Mitogene	P1A_m [cpm]	Kontrolle [cpm]	Ratio (P1A_m/Kontrolle)
w/o	3524	351	
PHA ₁ µg	77498	84417	0,92
PHA _{0.1} µg	4449	16996	0,26
OKT3 ₁₀ ng	25031	57729	0,43
OKT3 ₁ ng	8812	28352	0,31
SAC	68887	26487	2,6
PMA/I	193932	58286	3,33

cpm, *Counts per minute*; OKT3, Anti-CD3-Antikörper; PHA, Phytohämagglutinin; PMA/I, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat / Ionomycin; SAC, *S. aureus* Cowan I; w/o, *without*

Innerhalb der CD19⁺ B-Zellen war eine ausgeprägte Reduktion der klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen (1 % CD19⁺CD27⁺IgM⁻IgD⁻) zu erkennen (Tabelle 16).

Tabelle 16. B-Zellpopulationen P1A_m (LMU)

B-Zellen	P1A_m [Zellen/µl]	Normbereich [Zellen/µl]
CD27 ⁺	36	9-136
CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺	33	1-43
CD27 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻	1	5-74

CD, *Cluster of differentiation*

7.1.2.2. Humorale Immunität von P1A_m

Direkt nach der Geburt war der IgG-Spiegel trotz Leihmutter leicht erniedrigt (6,61 g/l). Der Titer von IgM war deutlich vermindert (0,05 g/l), während IgA sowie IgE im Normbereich lagen (Tabelle 17).

Tabelle 17. Immunglobuline von P1A_m (LMU)

Immunglobulin	P1A_m [g/l]	Normbereich [g/l]
IgG	6,61	7,5-15,5
IgM	0,05	0,11-0,35
IgA	< 0,04	-
IgE [IU/ml]	< 0,1	0-1,5

7.1.2.3. Funktionelle Analyse der angeborenen Immunität von P1A_m

Die Funktion der Toll-like- / IL-1-Rezeptor- sowie TNF- α -Signalkaskade wurde anhand einer quantitativen Zytokinbestimmung nach Stimulation mit TNF- α , PAM₂CSK₄ (TLR2/TLR6-Agonist), LPS (TLR4-Agonist) sowie IL-1 β im Nabelschnurblut des Patienten überprüft. Die Ausschüttung von IL-6 sowie von IL-10 war stark reduziert (Abbildung 7). Die Produktion von TNF- α nach Stimulation mit LPS lag mit 64,6 pg/ml unterhalb des Normbereichs (300-2000 pg/ml).

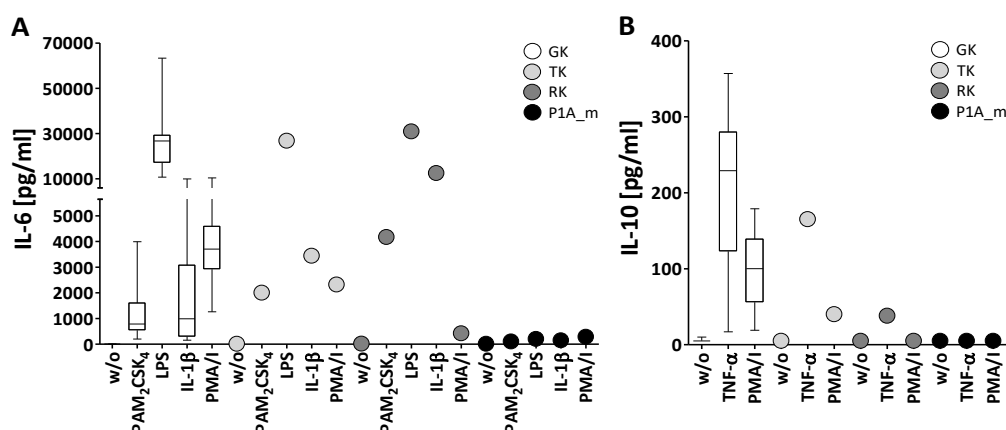


Abbildung 7. IL-6- und IL-10-Produktion im Nabelschnurblut von P1A_m nach Stimulation. Mit Hilfe von spezifischen TLR-Agonisten und Zytokinen wird die Signalkaskade der Toll-like- / IL-1-Rezeptor- sowie TNF- α -Signalwege aktiviert und die Produktion von IL-6 bzw. IL-10 eingeleitet. Die gesunde Kontrollkohorte (GK, n = 179) ist in weiß mit einer Markierung für den Mittelwert dargestellt (Whisker 5-95 Perzentile). Die Tageskontrolle (TK, n = 1) ist in hellgrau wiedergegeben, während die Reisekontrolle (RK, n = 1) in dunkelgrau dargestellt ist. Der Patient P1A_m (n = 1) wurde in schwarz wiedergegeben. A) Quantitativer Nachweis von IL-6 nach Stimulation mit PAM₂CSK₄ (TLR2-Agonist), LPS (TLR4-Agonist), IL-1 β und PMA / Ionomycin (PMA/I). (B) Quantitativer Nachweis von IL-10 nach Stimulation mit TNF- α und PMA / Ionomycin (PMA/I). IL-1 β , Interleukin-1 β ; LPS, Lipopolysaccharid; PMA, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat; TNF- α , Tumornekrosefaktor α ; w/o, without.

Die Ergebnisse (stark verminderte Anzahl an Gedächtnis-T-Zellen, eingeschränkte T-Zellproliferation, verminderte Anzahl an klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen, niedriges IgM, stark verminderte Produktion von IL-6 und IL-10 nach Aktivierung der Toll-like- / IL-1-Rezeptor- und TNF- α -Signalkaskade) wiesen auf einen ausgeprägten Defekt innerhalb der angeborenen und adaptiven Immunantwort des Patienten P1A_m hin.

7.1.3. NEMO-Expression von P1A_m

Um die NEMO-Expression zu bestimmen, wurde zunächst eine intrazelluläre NEMO-Färbung durchgeführt. Der Patient wies im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle eine verminderte, jedoch noch vorhandene NEMO-Expression in T-Zellen sowie in Monozyten auf (Abbildung 8).

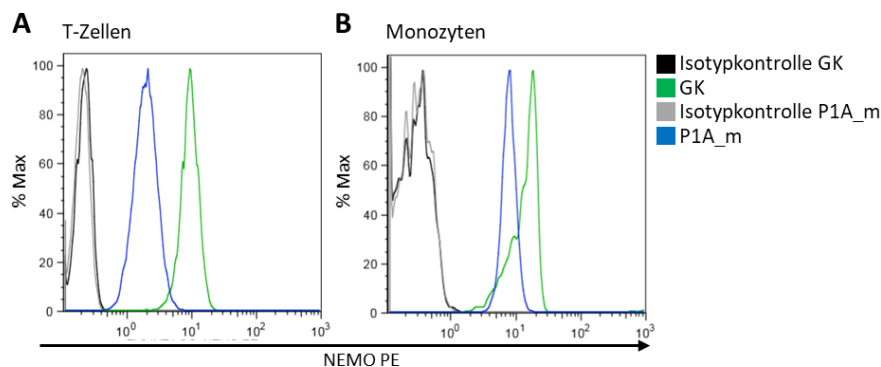


Abbildung 8. Intrazellulärer NEMO-Färbung P1A_m. Die Detektion erfolgte mit einem PE-gekoppelten anti-IKK γ -spezifischen Ak gegen den AS-Bereich 278 – 396 im Nabelschnurblut des Patienten. (A) Nachweis von NEMO in T-Zellen. (B) Nachweis von NEMO in Monozyten. Sowohl für die gesunde Kontrolle (GK, grün) als auch für den Patienten (P1A_m, blau) wurden parallel zum NEMO-Nachweis Isotypkontrollen (GK in schwarz, Patient in grau) verwendet. CD, Cluster of differentiation; PE, Phycoerythrin.

Anschließend wurde die NEMO-Expression in SV40-transformierten Fibroblasten des Patienten untersucht. Die Proteindetektion erfolgte mit drei anti-IKK γ (NEMO)-spezifischen Ak, die an unterschiedliche Bereiche des Proteins (CC1-CC2 Domäne, CC2-LZ-Domäne und ZF-Domäne) binden. P1A_m zeigte im Vergleich zur gesunden Kontrolle (48 kDa) nur eine kleinere Proteinvariante (ca. 41 kDa). Diese verkürzte Variante war in der negativen Kontrollzelllinie (SV40-Fibroblasten-Zelllinie mit bekanntem vollständigen NEMO-Defekt, Deletion Exon 4-10, Δ 4-10, NEMO^{-/-}) nicht detektierbar (Abbildung 9).

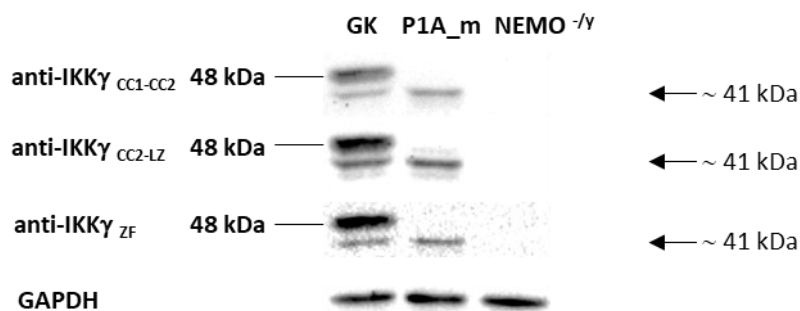


Abbildung 9. NEMO-Expression in SV40-Fibroblasten des Patienten P1A_m. Die Detektion erfolgte mit Hilfe von anti-IKK γ -spezifischen Ak gegen die AS-Regionen 150-300 (CC1-CC2-Domäne), 278-396 (CC2-LZ-Domäne) und 400-416 (ZF-Domäne) ($n = 2$, dargestellt ist ein repräsentativer Blot). Eine SV40-Zelllinie von einem gesunden Spender (GK) diente als positive Kontrolle, während eine NEMO-defiziente Zelllinie (NEMO^{-/-}) als negative Kontrolle eingesetzt wurde. Als Ladungskontrolle wurde ein anti-GAPDH-Ak verwendet ($n = 2$, dargestellt ist ein repräsentativer Blot). GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; GK, Gesunde Kontrolle; IKK, I κ B-Kinase; NEMO, *NF- κ B essential modulator*.

7.1.4. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Abbau in SV40-Fibroblasten des Patienten P1A_m

Die Auswirkung des NEMO-Defekts auf den Abbau der inhibitorischen Einheit $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nach Stimulation mit $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF-}\alpha$ wurde mit einem $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -spezifischen Westernblot analysiert. P1A_m zeigte wie die NEMO-defiziente Kontrollzelllinie keinen $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Abbau nach Stimulation mit $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF-}\alpha$ (Abbildung 10).

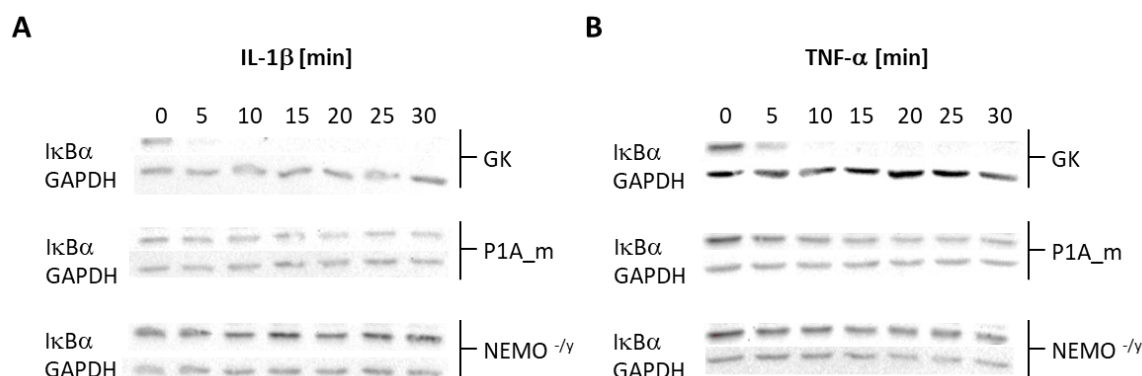


Abbildung 10. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Abbau von P1A_m nach Stimulation. (A) Abbau von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nach Stimulation mit $\text{IL-1}\beta$ in einer gesunden Kontrolllinie (GK), der Patientenlinie (P1A_m) sowie in einer negativen NEMO-defizienten Zelllinie (NEMO^{-/-}) (B) Abbau von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nach Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ in einer gesunden Kontrolllinie (GK), der Patientenlinie (P1A_m) sowie in einer negativen NEMO-defizienten Zelllinie (NEMO^{-/-}) (n = 2, dargestellt ist ein repräsentativer Blot). Als Ladungskontrolle diente ein anti-GAPDH-Ak. GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, *NF- κB inhibitor α* ; NEMO, *NF- κB essential modulator*.

7.1.5. Produktion von IL-6 durch SV40-Fibroblasten

SV40-Fibroblasten des Patienten P1A_m wurden mit $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ und PMA / Ionomycin stimuliert und das in den Zellkulturüberstand ausgeschüttete Zytokin IL-6 mit einem anti-IL-6-ELISA bestimmt. Als Kontrolllinien dienten eine gesunde SV40-Spenderlinie sowie eine NEMO-defiziente SV40-Fibroblasten-Zelllinie. P1A_m zeigte im Vergleich zur gesunden Kontrolllinie eine fast fehlende Produktion von IL-6 (Abbildung 11).

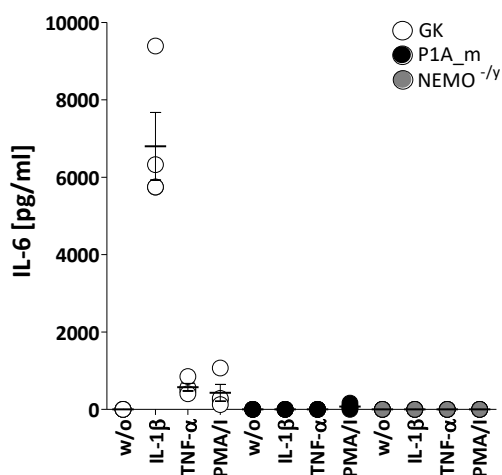


Abbildung 11. IL-6-Produktion von SV40-Fibroblasten P1A_m nach Stimulation. SV40-Fibroblasten von einem gesunden Spender (GK, n = 4, Mittelwert mit SEM), dem Patienten P1A_m (n = 4) sowie einer NEMO-defizienten Linie (NEMO^{-/-}, n = 4) wurden mit $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ und PMA / Ionomycin (PMA/I) stimuliert und die Konzentration von IL-6 im Zellkulturüberstand mit einem anti-IL-6-ELISA quantitativ bestimmt. NEMO, *NF- κB essential modulator*; PMA, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat; SEM, *Standard error of mean*; w/o, *without*.

7.1.6. Auswirkung der *IKBK*G-Mutation IVS9+1 G>A auf die C-terminale funktionelle ZF-Domäne

Die Mutation IVS9+1 G>A befindet sich im intronisch-liegenden Sequenzbereich zwischen dem neunten und zehnten Exon von *IKBK*G (NG_009896.1, Donor-Spleißstelle). Das Gen beinhaltet insgesamt 10 Exons, von denen nur neun translatiert werden (Abbildung 12A). Der Sequenzabschnitt zwischen dem achten und zehnten Exon wurde mit Hilfe eines definierten Primerpaars amplifiziert und der Mutationslokus im erhaltenen PCR-Produkt mit Hilfe einer Sanger-Sequenzierung bestätigt (Abbildung 12B).

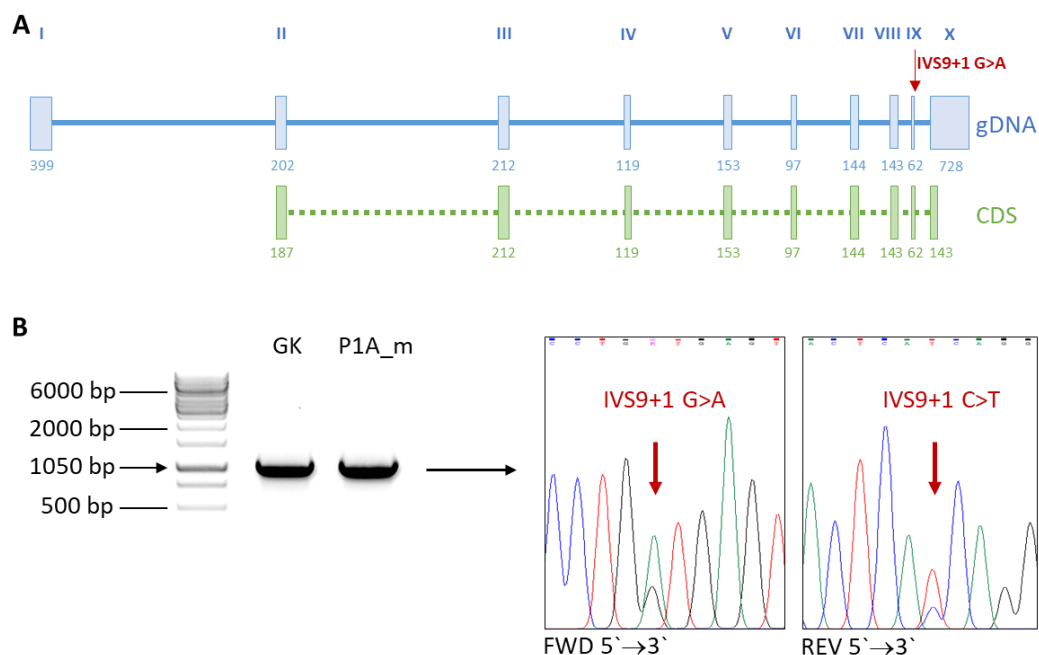
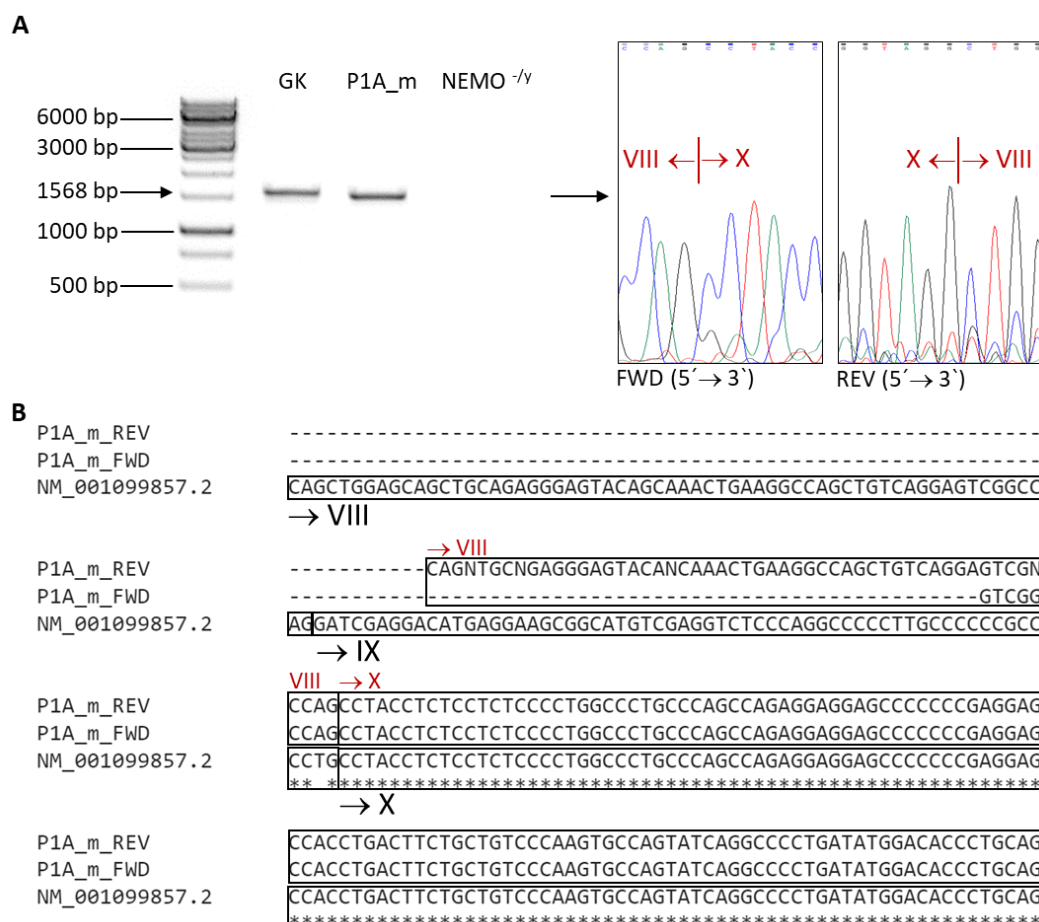


Abbildung 12. Schematische Darstellung der Mutation IVS9+1 G>A auf genomischer Ebene. (A) Das NEMO-kodierende Gen *IKBK*G verfügt über 10 Exons (I – X, blau). Die Protein-kodierende Sequenz (*coding sequence*, CDS, grün) wird durch die Exons II – X kodiert. Die Mutation IVS9+1 G>A befindet sich im intronisch-liegenden Bereich zwischen dem neunten und zehnten Exon. (B) Das PCR-Produkt umfasst den Sequenzabschnitt zwischen dem achten und zehnten Exon (1050 bp) und wurde auf einem 1 % Agarosegel aufgetragen (links). Anschließend erfolgte eine Sanger-Sequenzierung des aufgereinigten PCR-Produkts und die Lokalisationsbestimmung der Mutation IVS9+1 G>A (rechts). Die DNA wurde aus SV40-Fibroblasten des Patienten P1A_m generiert. FWD, *Forward*; gDNA, *Genomic deoxyribonucleic acid*; GK, *Gesunde Kontrolle*; IVS, *Intervening sequence*; REV, *Reverse*.

Aufgrund des Hintergrundsignals im Chromatogramm (Abbildung 12B), welches auf eine Heterozygotie bzw. einen Mutationslokus im Pseudogen *IKBK*GP (verläuft parallel zu *IKBK*G) hindeutete, wurde eine *long-range* PCR mit einem *IKBK*G-spezifischen Amplifikat (Exon 2-10, Länge > 12 kb, siehe Tabelle 5) im Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm unter der Leitung von Dr. Klaus Schwarz durchgeführt. Die hemizygoten *IKBK*G-Mutation IVS9+1 G>A wurde bestätigt und auf dem Pseudogen *IKBK*GP ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).



52

Die Auswirkung der Exon-9-Deletion auf Proteinebene wurde schematisch analysiert. Die um 62 bp verkürzte kodierende Sequenz wurde mit Hilfe der EMBOSS Transeq Software in die entsprechende AS-Sequenz umgeschrieben und mit der ursprünglichen NEMO-Sequenz verglichen. Als Referenzsequenz diente die Transkriptionsvariante 1 (NP_001093327.1) mit 419 AS. Die Deletion führt zu einem AS-Austausch von Arginin zu Serin an der Position 352 (p. R352S). Eine Verschiebung des Leserasters mit vorzeitigem Stopcodon an der Position 373 und der Verlust der C-terminalen ZF-Domäne sind die Folge (Abbildung 14).

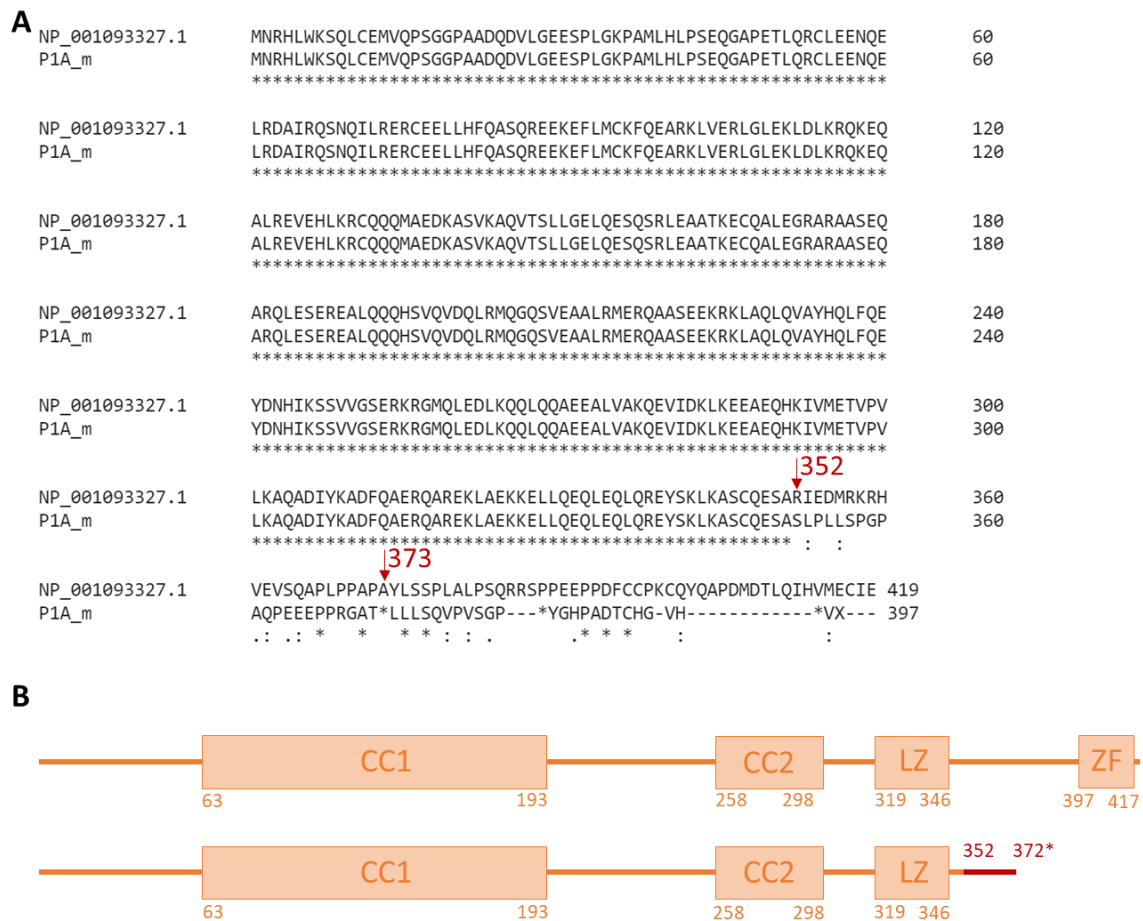


Abbildung 14. Schematische Darstellung des NEMO-Proteins von P1A_m. (A) Vergleich der Wildtyp AS-Sequenz von NEMO (NP_001093327.1) und der AS-Sequenz von P1A_m. Der Patient weist einen AS-Austausch an der Position p. R352S auf, welcher zu einer Verschiebung des Leserasters mit Stopcodon (*) an der Position 373 führt. (B) Darstellung der NEMO-Domänen CC1, CC2, LZ und ZF (oben). Die Leserasterverschiebung mit Stopcodon beim Patienten P1A_m führt zu einem Verlust der C-terminalen ZF-Domäne (unten). CC, *Coiled-coil*; LZ, *Leuzinzipper*; ZF, *Zinkfinger*.

7.1.7. Klinischer Verlauf von P1A_m

Aufgrund der schweren immunologischen Einschränkungen erhielt P1A_m direkt nach der Geburt eine prophylaktische Antibiotikatherapie. Die Eltern lehnten eine HSZT sowie eine überbrückende IgG-Substitution zunächst ab. Die histologische Untersuchung einer Hautbiopsie zeigte fehlende Schweißdrüsen. Basierend auf einer *Enterobacter aerogenes* Sepsis und einer *Pneumocystis jirovecii* Pneumonie (PJP) litt P1A_m im Alter von drei Monaten an Fieber (39,4 °C) und präsentierte ein erhöhtes CrP (136,7 mg/l) sowie eine verminderte Sauerstoffsättigung. IgG (1,35 g/l) und IgM (0,03 g/l) waren weiter abgefallen. Im Alter von sechs Monaten wurde P1A_m erneut mit einer *E. aerogenes* Infektion (Osteomyelitis des rechten Knies) vorstellig. Zusätzlich zeigte er ein Lymphödem am linken Oberschenkel, wodurch alle Merkmale einer EDA-ID-L erfüllt waren. Unter Verweis auf die drei lebensbedrohlichen Erkrankungen im ersten halben Lebensjahr und den nachgewiesenen T-Zelldefekt wurde den Eltern erneut eine HSZT empfohlen. Diese wurde im Alter von neun Monaten mit einem HLA-kompatiblen unverwandten Spender durchgeführt. Fünf Monate nach der HSZT entwickelte P1A_m bei vollem Spenderchimärismus eine schwere autoimmune Thrombozytopenie, welche sich unter Steroiden, einer intravenösen IgG-Substitution und einer anti-CD20-Therapie rückläufig zeigte und unter Anwendung einer anti-CD38-Therapie komplett verschwand. Acht Monate nach der HSZT entwickelte P1A_m eine schwere Colitis (blutiger Stuhl, Hämoglobin-Abfall), der eine *Graft versus Host Disease* (GvHD) zu Grunde liegen bzw. die durch die Persistenz NEMO-defizienter Enterozyten vermittelt sein kann. Parallel dazu durchlief P1A_m eine erneute *E. aerogenes* Bakteriämie. Die inzwischen chronische Colitis wird mit Prednisolon, einer anti-TNF- α -Therapie und JAK-Inhibitoren behandelt. P1A_m ist zum jetzigen Zeitpunkt 2 ¹¹/₁₂ Jahre alt und präsentiert seit der HSZT eine Pigmentstörung der Haut sowie eine leichte Wachstumsverzögerung.

7.1.8. Klinischer und immunologischer Phänotyp dreier NEMO-Defekt Patienten mit bekannter hemizygoter *IKBKG*-Mutation in der kodierenden Sequenz

Die hier aufgeführten Patienten werden aufgrund eines NEMO-Defekts seit ihrer frühen Kindheit in der Immundefektambulanz der Charité- Universitätsmedizin Berlin betreut.

7.1.8.1. Klinischer Verlauf von Patient P1B_m

Der Patient P1B_m weist eine EDA-ID mit AS-Austausch im NEMO-Protein (c. T239C, Leucin → Prolin, p. L80P) auf [178]. Ein jüngerer Bruder verstarb im Alter von drei Jahren an einer vermutlich bakteriellen Meningitis. P1B_m erkrankte vermehrt an fieberhaften Infektionen der oberen Atemwege, Pneumonien und Bronchitiden. Hinzu kam eine chronische Erkrankung der Atemwege in Form von Asthma bronchiale. Des Weiteren leidet er an wiederkehrenden Herpesläsionen (*Herpes labialis*), Nasenbluten und Durchfällen. P1B_m entwickelte im Alter von 13 Jahren einen beidseitigen, essentiellen Tremor an den Händen. Eine ähnliche Symptomatik ist auch bei der Mutter bekannt. Es wurde ein verzögerter Zahnwechsel trotz vorhandener Zahnanlagen festgestellt. Im weiteren Verlauf erfolgte eine Versorgung mit Zahnimplantaten. Trotz Impfungen nach STIKO-Empfehlung präsentierte P1B_m eine verminderte Konzentration an Polysaccharid-spezifischen Antikörpern gegen das Pneumokokken-Kapsel-Polysaccharid (*pneumococcal capsular polysaccharide*, PCP, anti-PCP-IgG < 4,0 mg/l; anti-PCP-IgG₂ < 1,30 mg/l). Als Therapie wurden eine subkutane IgG-Substitution und eine prophylaktische Antibiotikagabe gewählt. Die antibiotische Prophylaxe wurde aufgrund von weniger häufigen bakteriellen Infektionen im Alter von 15 Jahren (nach der Pubertät) beendet. P1B_m ist derzeit 26 ¹/₁₂ Jahre alt und weist unter IgG-Substitution keine pathologische Infektionsanfälligkeit auf.

7.1.8.2. Immunologischer Phänotyp von P1B_m

Die Analysen des Patienten P1B_m erfolgten im Alter von 1 ¹/₂ bzw. im Rahmen der vorliegenden Arbeit von 25 ¹/₂ Jahren. Zu Beginn präsentierte der Patient eine normale Verteilung der einzelnen Lymphozytenpopulationen. In der aktuellen Analyse zeigte er eine leichte T-Zell-Lymphopenie mit numerisch unauffälligen B- und NK-Zellen (Tabelle 18).

Tabelle 18. Lymphozytenpopulationen von P1B_m

		P1B_m	Normbereich	P1B_m	Normbereich
Alter		1 ½ Jahre		25 ½ Jahre	
		Zellen/μl		Zellen/μl	
T-Zellen	CD3 ⁺	3853	1400-8000	720	900-2200
	CD4 ⁺	2367	900-5500	380	500-1200
	CD8 ⁺	936	400-2300	240	300-800
Ratio CD4/CD8		2,50	0,90-3,70	1,6	1,1-3,0
B-Zellen	CD19 ⁺	1266	600-2700	140	100-400
NK-Zellen		220	100-1400	170	100-400

CD, Cluster of differentiation; NK-Zelle, Natürliche Killerzelle

Sowohl die CD45RA⁺ naiven als auch die CD45RO⁺ Gedächtnis-T-Zellen des Patienten lagen im Normbereich (Tabelle 19). Der Anteil an $\gamma\delta^+$ T-Zellen war normal (Tabelle 20).

Tabelle 19. T-Zellpopulationen von P1B_m

Naive / Gedächtnis-T-Zellen		P1B_m	Normbereich	P1B_m	Normbereich
Alter		1 ½ Jahre		25 ½ Jahre	
		%		%	
T-Helferzelle	CD45RA ⁺	75	75,80-88,90	29	16-100
CD4 ⁺	CD45RO ⁺	11	10,00-15,60	71	18-95
Zytotoxische	CD45RA ⁺	-	-	75	6-100
T-Zellen	CD8 ⁺ CD45RO ⁺	-	-	24	-

CD, Cluster of differentiation

Tabelle 20. TZR-positive T-Zellen von P1B_m

T-Zellen		P1B_m	Normbereich	P1B_m	Normbereich
Alter		1 ½ Jahre		25 ½ Jahre	
		%		%	
TZR ⁺	$\gamma\delta^+$	2	-	14	< 15
	$\alpha\beta^+$	68	-	86	> 90
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	$\alpha\beta^+$	-	-	2,66	< 2,00

CD, Cluster of differentiation

Die Lymphozyten-Proliferation des Patienten lag nach Stimulation mit spezifischen T- und B-Zell-Mitogenen im Normbereich. Die B-Zellproliferation nach Stimulation mit *S. aureus* Cowan I (SAC) war jedoch vermindert. Die Lymphozyten zeigten nach Stimulation mit Tetanus-Toxoid eine normale, nach Stimulation mit Candida und Diphtherie eine verminderte Proliferation (Tabelle 21).

Tabelle 21. Lymphozyten-Proliferation von P1B_m nach Stimulation (25 ½ Jahre)

Stimulation		P1B_m	TK	Normbereich
w/o	cpm	10	16	
PHA		1225,70	2113,00	> 50
aCD3		167,80	889,40	> 30
IL-2		167,60	170,10	> 30
PWM		131,5	471,70	> 20
SAC	SI	5,30	17,10	> 10
Tetanus Toxoid		44,00	13,60	> 3,0
Diphtherie		1,40	3,00	> 3,0
Candida		1,10	5,90	> 3,0

aCD3, Anti-CD3-Antikörper; cpm, *Counts per minute*; IL-2, Interleukin-2, PHA, Phytohämagglutinin; PWM, *Pokeweed mitogen*; SAC, *S. aureus* Cowan I; SI, Stimulationsindex; TK, Tageskontrolle; w/o, *without*

Die CD19⁺ B-Zellpopulationen waren bei dem Patienten unauffällig (Tabelle 22).

Tabelle 22. B-Zellpopulationen von P1B_m (25 ½ Jahre)

B-Zellen		P1B_m [%]	Normbereich [%]
-		13,00	5,00-25,00
CD19 ⁺	CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺	68,50	42,60-82,30
	CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺	9,00	7,40-32,50
	CD27 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻	11,70	6,50-29,10

CD, *Cluster of differentiation*

Der Spiegel der einzelnen Immunglobuline war mit Ausnahme der IgG₂- und IgM-Konzentration unauffällig. IgG₂ lag zu Beginn im unteren Grenzbereich. IgM war persistent reduziert. Der Patient erhält aufgrund seiner Hypogammaglobulinämie eine IgG-Substitution (Tabelle 23).

Tabelle 23. Immunglobuline von P1B_m

Immunglobulin	P1B_m	Normbereich	P1B_m	Normbereich
	Alter			
	1 ½ Jahre		25 ½ Jahre	
	Konzentration [g/l]		Konzentration [g/l]	
IgG	10,16	5,20-10,80	12,50	7,00-16,00
IgG ₁	8,57	1,70-6,50	6,77	2,80-8,00
IgG ₂	0,48	0,40-1,40	2,07	1,12-5,70
IgG ₃	0,97	0,12-0,87	2,04	0,24-1,25
IgG ₄	0,14	0,00-0,26	0,27	0,05-1,25
IgA	-	-	2,47	0,70-4,00
	0,17 (7 ½ Jahre)	0,60-1,75		
IgM	0,16 (13 ¼ Jahre)	0,60-2,50	0,43	0,40-2,30
	0,29 (16 ½ Jahre)	0,50-1,94		

Um die Funktion der Toll-like- / IL-1-Rezeptor- sowie TNF- α -Signalkaskade zu überprüfen wurde die IL-6- und IL-10-Produktion nach Stimulation mit TNF- α , PAM₂CSK₄ (TLR2/TLR6-Agonist), LPS (TLR4-Agonist) sowie IL-1 β bestimmt und mit einer gesunden Tageskontrolle sowie einer Kontrollkohorte verglichen. Die Ausschüttung von IL-6 lag im niedrigen Normbereich. Die IL-10-Produktion war nach Einsatz von TNF- α stark reduziert (Abbildung 15).

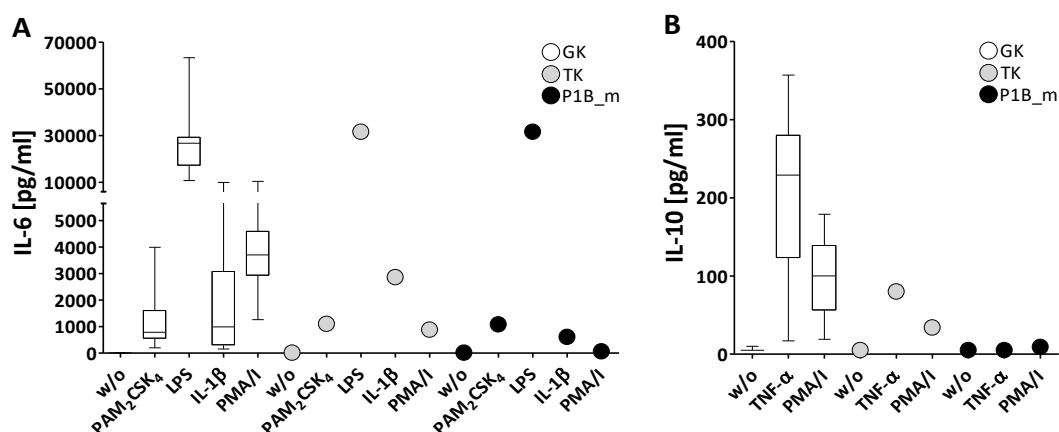


Abbildung 15. IL-6- und IL-10-Produktion von P1B_m nach Stimulation. Mit Hilfe von spezifischen TLR-Agonisten und Zytokinen wird die Signalkaskade der Toll-like- / IL-1-Rezeptor- sowie TNF- α -Signalwege aktiviert und die Produktion von IL-6 bzw. IL-10 eingeleitet. Die gesunde Kontrollkohorte (GK, n = 179) ist in weiß dargestellt (Whiskers 5-95 Perzentile). Die Tageskontrolle (TK, n = 1) ist in hellgrau wiedergegeben. Der Patient P1B_m (n = 1) ist in schwarz dargestellt. (A) Quantitativer Nachweis von IL-6 nach Stimulation mit PAM₂CSK₄ (TLR2-Agonist), LPS (TLR4-Agonist), IL-1 β und PMA / Ionomycin (PMA/I). (B) Quantitativer Nachweis von IL-10 nach Stimulation mit TNF- α und PMA / Ionomycin (PMA/I). IL-1 β , Interleukin-1 β ; LPS, Lipopolysaccharid; PMA, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat; TNF- α , Tumornekrosefaktor α ; w/o, without.

7.1.8.3. Klinischer Verlauf von Patient P1C_m

P1C_m weist einen ID ohne EDA mit AS-Austausch im NEMO-Protein (Asparaginsäure \rightarrow Asparagin, p. D113N) auf. Er hat eine klinisch unauffällige jüngere Schwester. Seine Mutter sowie seine Tante sind Konduktorinnen der entsprechenden *IKBK*-Mutation (c. 337 G>A). Sein Cousin ist ebenfalls Mutationsträger (Abbildung 16). P1C_m erkrankte bereits ab dem 3. Lebensmonat vermehrt an hochfieberhaften Atemwegsinfektionen, Pneumonien, Bronchitiden, Otitiden und Konjunktividen. Zusätzlich litt er vermehrt an rezidivierenden Diarrhoen und kutanen Herpesläsionen. Im Alter von sechs Jahren waren sowohl der Haut- als auch der Zahnstatus unauffällig. Er wurde nach STIKO-Empfehlung geimpft, präsentierte jedoch eine verminderte Konzentration an Polysaccharid-spezifischen Ak (anti-PCP-IgG 18,70 mg/l - Referenz 0,80-262,10 mg/l; anti-PCP-IgG₂ 3,20 mg/l - Referenz 1,20-113,40 mg/l). Prophylaktisch wurden eine IgG-Substitution und eine Antibiotikagabe bei Bedarf begonnen. Der Patient ist derzeit 10 ³/₁₂ Jahre alt und war im vergangenen Jahr vermehrt an viralen Infekten mit Kopfschmerzen und Durchfällen erkrankt. Er erkrankte seit Beginn der IgG-Substitution an keiner weiteren Pneumonie.

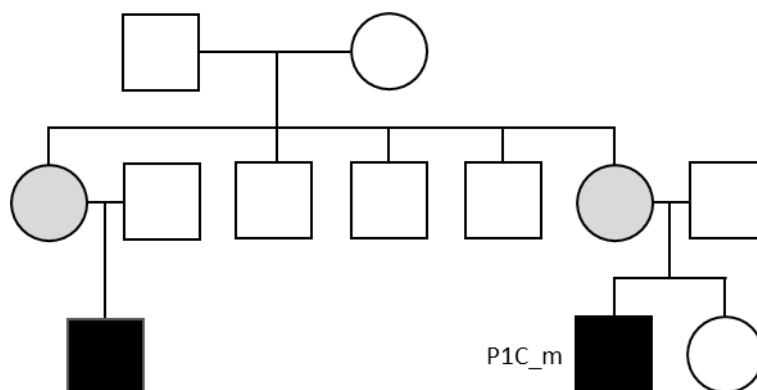


Abbildung 16. Stammbaum des Patienten P1C_m. Die Mutter und die Tante des Patienten sind Konduktorinnen der *IKBKG*-Mutation c. G337A (grau). Diese führt zu einem AS-Austausch von Asparaginsäure zu Asparagin an der Position 113 (p. D113N). Der Patient P1C_m sowie sein Cousin tragen die hemizygoten Mutation (schwarz). Der Cousin zeigt keine pathologische Infektionsanfälligkeit. □, männlich; ○, weiblich.

7.1.8.4. Immunologischer Phänotyp von P1C_m

Die Untersuchungen des Patienten P1C_m erfolgten im Alter von 3 ¼ bzw. im Rahmen der vorliegenden Arbeit von 9 ¾ Jahren. P1C_m zeigte eine normale Verteilung der einzelnen Lymphozytenpopulationen (Tabelle 24).

Tabelle 24. Lymphozytenpopulationen von P1C_m (9 ¾ Jahre)

		P1C_m [Zellen/ μ l]	Normbereich [Zellen/ μ l]
T-Zellen	CD3 ⁺	2040	700-4200
	CD4 ⁺	1180	300-2000
	CD8 ⁺	730	300-1800
Ratio CD4/CD8		1,6	0,90-2,60
B-Zellen	CD19 ⁺	330	200-1600
NK-Zellen		540	90-900

CD, Cluster of differentiation; NK-Zelle, Natürliche Killerzelle

Auch die Verteilung der CD45RA⁺ naiven sowie CD45RO⁺ Gedächtnis-T-Zellen war unauffällig (Tabelle 25).

Tabelle 25. T-Zellpopulationen von P1C_m (9 ¾ Jahre)

Naive / Gedächtnis-T-Zellen		P1C_m [%]	Normbereich [%]
T-Helferzelle	CD45RA ⁺	57	46-99
CD4 ⁺	CD45RO ⁺	43	0,35-100
Zytotoxische T-Zellen	CD45RA ⁺	73	16-100
CD8 ⁺	CD45RO ⁺	26	-

CD, Cluster of differentiation

Die Anteile der $\gamma\delta^+$ als auch der $\alpha\beta^+$ TZR-positiven T-Zellen lagen im Normbereich (Tabelle 26).

Tabelle 26. TZR-positive T-Zellen von P1C_m (9 ¼ Jahre)

T-Zellen		P1C_m [%]	Normbereich [%]
TZR ⁺	$\gamma\delta^+$	7	< 15
	$\alpha\beta^+$	93	> 90
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	$\alpha\beta^+$	0,82	< 2,00

CD, Cluster of differentiation

Die Lymphozyten-Proliferation nach Stimulation mit spezifischen T- und B-Zell-Mitogenen war normal (Tabelle 27).

Tabelle 27. Lymphozyten-Proliferation von P1C_m nach Stimulation (9 ¼ Jahre)

Stimulation		P1C_m	Tageskontrolle	Normbereich
w/o	cpm	19	19	
PHA		1562,30	1093,40	> 50
aCD3		771,50	517,70	> 30
IL-2		195,40	55,90	> 30
PWM	SI	312,30	180,70	> 20
SAC		29,60	38,50	> 10
Tetanus Toxoid		570,50	105,80	> 3,0
Diphtherie		55,10	10,20	> 3,0
Candida		27,70	75,10	> 3,0

aCD3, Anti-CD3-Antikörper; cpm, *Counts per minute*; IL-2, Interleukin-2; PHA, Phytohämagglutinin; PWM, *Pokeweed mitogen*; SAC, *S. aureus* Cowan I; SI, Stimulationsindex; w/o, *without*

Die Verteilung der naiven als auch der IgM⁻IgD⁻ klassengewechselten CD19⁺ B-Zellen war normal (Tabelle 28).

Tabelle 28. B-Zellpopulationen von P1C_m

B-Zellen		P1C_m	Normbereich	P1C_m	Normbereich
	Alter	3 ¼ Jahre		9 ¼ Jahre	
		%		%	
	-	-	-	11,00	10,00-31,00
CD19 ⁺	CD27 ⁻ IgM ⁺ IgD ⁺	77,96	73,00-89,00	68,90	67,80-89,00
	CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺	12,26	5,70-14,30	14,00	5,00-16,20
	CD27 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻	5,00	3,00-10,30	6,30	4,00-14,00

CD, Cluster of differentiation

P1C_m präsentierte im Alter von 3 ¼ Jahren eine leichte Hypogammaglobulinämie mit vermindertem IgG und IgG₄ sowie grenzwertigem IgM. Der Patient erhält seit seinem 3 9/12 Lebensjahr eine IgG-Substitution (Tabelle 29).

Tabelle 29. Immunglobuline von P1C_m

Immunglobulin	P1C_m	Normbereich	P1C_m	Normbereich
	Alter			
	3 ¼ Jahre		9 ¾ Jahre	
	Konzentration [g/l]		Konzentration [g/l]	
IgG	4,50	5,04-14,64	12,96(+IgG)	6,98-15,60
IgG ₁	3,36	2,70-8,10	7,30	3,70-9,30
IgG ₂	0,78	0,65-2,20	3,48	1,00-4,00
IgG ₃	0,22	0,16-0,96	0,52	0,22-1,09
IgG ₄	0,01	0,012-0,94	0,09	0,04-1,90
IgA	0,39	0,27-1,95	0,41	0,53-2,04
IgM	0,25	0,24-2,10	0,36	0,31-1,79

+IgG, IgG-Substitution

Die Funktion der Toll-like- / IL-1-Rezeptor- sowie TNF- α -abhängigen Signalwege wurde über die Produktion von IL-6 und IL-10 nach Stimulation mit TNF- α , PAM₂CSK₄ (TLR2/TLR6-Agonist), LPS (TLR4-Agonist) sowie IL-1 β überprüft. Die IL-6-Produktion lag nach Einsatz von PAM₂CSK₄ und IL-1 β im unteren Normbereich. Die IL-10-Produktion war nach Einsatz von TNF- α im Vergleich zur gesunden Tageskontrolle unauffällig (Abbildung 17).

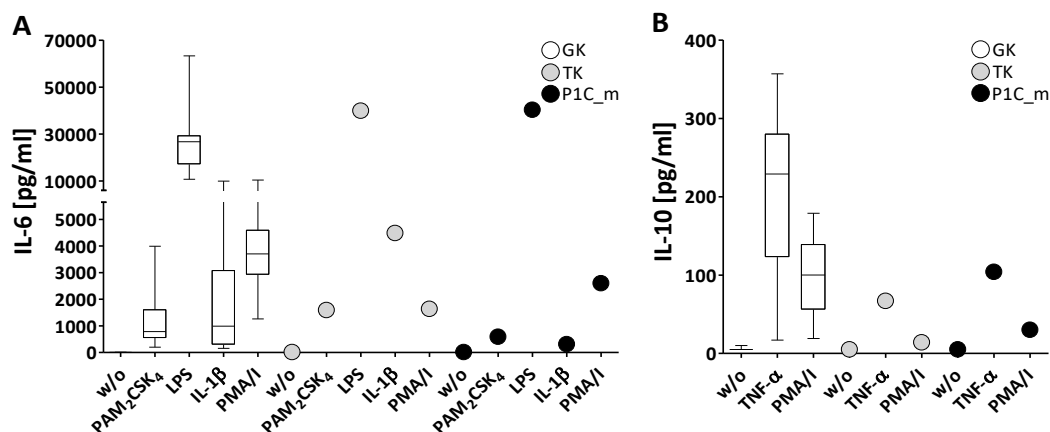


Abbildung 17. IL-6- und IL-10-Produktion von P1C_m nach Stimulation. Die Signalkaskade der Toll-like- / IL-1-Rezeptor- sowie TNF- α -Signalwege wird mittels spezifischer TLR-Agonisten und Zytokinen aktiviert und die Produktion von IL-6 bzw. IL-10 eingeleitet. Die gesunde Kontrollkohorte (GK, n = 179) ist in weiß dargestellt (Whiskers 5-95 Perzentile). Die Tageskontrolle (TK, n = 1) ist in hellgrau wiedergegeben. Der Patient P1C_m (n = 1) ist in schwarz dargestellt. (A) Quantitativer Nachweis von IL-6 nach Stimulation mit PAM₂CSK₄ (TLR2-Agonist), LPS (TLR4-Agonist), IL-1 β und PMA / Ionomycin (PMA/I). (B) Quantitativer Nachweis von IL-10 nach Stimulation mit TNF- α und PMA / Ionomycin (PMA/I). IL-1 β , Interleukin-1 β ; LPS, Lipopolysaccharid; PMA, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat; TNF- α , Tumornekrosefaktor α ; w/o, without.

7.1.8.5. Klinischer Verlauf von Patient P1D_m

P1D_m weist einen milden ID ohne EDA basierend auf einem AS-Austausch im NEMO-Protein (c. G956A, Arginin → Glutamin, p. R319Q) auf [179]. Er hat einen gesunden Bruder. Im Alter von 1 ½ Jahren entwickelte er einen schweren zervikalen Lymphknotenabszess durch *H. influenzae* Typ B. Er litt im Kindesalter mehrfach an Pneumonien und Otitiden. Im Alter von acht Jahren erkrankte er an einer schweren EBV-Infektion in dessen Folge er über ein Jahr lang an Erschöpfung litt. Ein positiver Tuberkulin-Hauttest bei negativem IFN- γ -Test (ELISPOT) führte zu der Annahme einer bestehenden mykobakteriellen Infektion mit anschließender 3-monatiger Isoniazid-Therapie. Seine Haut sowie sein Zahnstatus zeigten zu keinem Zeitpunkt Auffälligkeiten. Trotz MMR- und Pneumokokken-Impfung besaß P1D_m nur eine verminderte Ak-Konzentration (Masern-IgG negativ; anti-PCP-IgG 10,90 mg/l; anti-PCP-IgG₂ 1,92 mg/l). Als Therapie wurde eine Antibiotikagabe bei Bedarf gewählt. P1D_m ist aktuell 25 ⁷/₁₂ Jahre alt und in einem guten gesundheitlichen Zustand. Er hat vereinzelt wiederkehrend eitrige Otitiden (sonst keine weiteren Infektionen).

7.1.8.6. Immunologischer Phänotyp von P1D_m

Die Analyse des Patienten erfolgte im Rahmen dieser Arbeit im Alter von 25 ¹/₁₂ Jahren. P1D_m zeigte eine leichte CD8⁺T-Zell-Lymphopenie mit numerisch unauffälligen B- und NK-Zellen (Tabelle 30).

Tabelle 30. Lymphozytenpopulationen von P1D_m

Zellpopulation		P1D_m [Zellen/ μ l]	Normbereich [Zellen/ μ l]
T-Zellen	CD3 ⁺	860	900-2200
	CD4 ⁺	570	500-1200
	CD8 ⁺	240	300-800
Ratio CD4/CD8		2,4	1,1-3,0
B-Zellen	CD19 ⁺	310	100-400
NK-Zellen		270	100-400

CD, Cluster of differentiation; NK-Zelle, Natürliche Killerzelle

Seine naiven CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen waren leicht vermindert (Tabelle 31).

Tabelle 31. T-Zellpopulationen von P1D_m

Naive / Gedächtnis-T-Zellen		P1D_m [%]	Normbereich [%]
T-Helferzelle CD4 ⁺	CD45RA ⁺	7	16-100
	CD45RO ⁺	93	18-95
Zytotoxische T-Zellen CD8 ⁺	CD45RA ⁺	20	6-100
	CD45RO ⁺	80	-

CD, Cluster of differentiation

Die $\gamma\delta^+$ als auch die $\alpha\beta^+$ TZR-positiven T-Zellen lagen im Normbereich (Tabelle 32).

Tabelle 32. TZR-positive T-Zellen von P1D_m

T-Zellen		P1D_m [%]	Normbereich [%]
TZR ⁺	$\gamma\delta^+$	5	< 15
	$\alpha\beta^+$	95	> 90
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	$\alpha\beta^+$	1,35	< 2,00

CD, Cluster of differentiation

Die Lymphozyten-Proliferation lag nach Stimulation mit spezifischen T- und B-Zell-Mitogenen bzw. Antigenen im Normbereich. Die Proliferation nach Stimulation mit dem Diphtherie-Antigen war jedoch vermindert (Tabelle 33).

Tabelle 33. Lymphozyten-Proliferation von P1D_m nach Stimulation

Stimulation		P1D_m	TK	Normbereich
w/o	cpm	15	14	
PHA		1103,80	539,40	> 50
aCD3		542,20	255,20	> 30
IL-2		94,50	71,50	> 30
PWM	SI	170,60	165,10	> 20
SAC		30,00	22,50	> 10
Tetanus Toxoid		43,50	229,40	> 3,0
Diphtherie		2,70	30,10	> 3,0
Candida		5,20	55,90	> 3,0

aCD3, Anti-CD3-Antikörper; cpm, Counts per minute; IL-2, Interleukin-2; PHA, Phytohämagglutinin; PWM, Pokeweed mitogen; SAC, *S. aureus* Cowan I; SI, Stimulationsindex; TK, Tageskontrolle; w/o, without

P1D_m präsentierte einen verminderten Anteil an CD27⁺IgM⁺IgD⁺ und CD27⁺IgM⁻IgD⁻ klassengewechselten B-Zellen (Tabelle 34).

Tabelle 34. B-Zellpopulationen von P1D_m

B-Zellen		P1D_m [%]	Normbereich [%]
CD19 ⁺	-	21,00	5,00-25,00
	CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺	83,90	42,60-82,30
	CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺	6,90	7,40-32,50
	CD27 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻	3,00	6,50-29,10

CD, Cluster of differentiation

Die Spiegel der einzelnen Immunglobuline lagen im Normbereich (Tabelle 35).

Tabelle 35. Immunglobuline von P1D_m

Immunglobulin	P1D_m [g/l]	Normbereich [g/l]
IgG	12,37	7,00-16,00
IgG ₁	7,42	2,80-8,00
IgG ₂	2,34	1,12-5,70
IgG ₃	1,03	0,24-1,25
IgG ₄	0,32	0,05-1,25
IgA	2,94	0,70-4,00
IgM	0,86	0,40-2,30

Die Funktion der Toll-like- / IL-1-Rezeptor- sowie TNF- α -Signalkaskade wurde anhand der IL-6- sowie IL-10-Produktion nach Stimulation mit TNF- α , PAM₂CSK₄ (TLR2/TLR6-Agonist), LPS (TLR4-Agonist) sowie IL-1 β überprüft. Die IL-6-Produktion war normal. Die IL-10-Konzentration nach TNF- α Stimulation war stark reduziert (Abbildung 18).

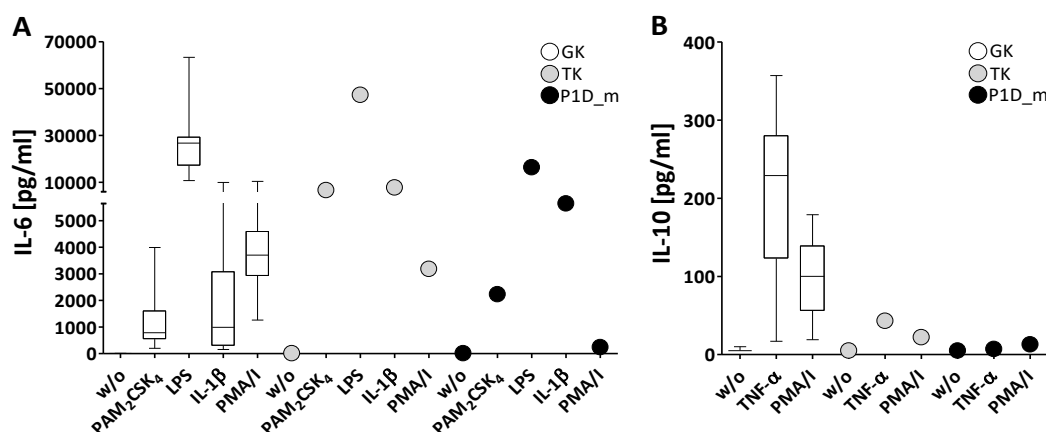


Abbildung 18. IL-6- und IL-10-Produktion von P1D_m nach Stimulation. Mittels spezifischer TLR-Agonisten und Zytokinen wird die Signalkaskade der Toll-like- / IL-1-Rezeptor- sowie TNF- α -Signalwege aktiviert und die Produktion von IL-6 bzw. IL-10 eingeleitet. Die gesunde Kontrollkohorte (GK, n = 179) ist in weiß dargestellt (Whiskers 5-95 Perzentile). Die Tageskontrolle (TK, n = 1) ist in hellgrau wiedergegeben. Der Patient P1D_m (n = 1) ist in schwarz dargestellt. (A) Quantitativer Nachweis von IL-6 nach Stimulation mit PAM₂CSK₄ (TLR2-Agonist), LPS (TLR4-Agonist), IL-1 β und PMA / Ionomycin (PMA/I). (B) Quantitativer Nachweis von IL-10 nach Stimulation mit TNF- α und PMA / Ionomycin (PMA/I). IL-1 β , Interleukin-1 β ; LPS, Lipopolysaccharid; PMA, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat; TNF- α , Tumornekrosefaktor α ; w/o, without.

7.1.9. NEMO-Expression von P1B_m, P1C_m und P1D_M

Die *IKBKG*-Mutationen der Patienten P1B_m, P1C_m und P1D_m führen zu einem AS-Austausch im Bereich der CC1-Domäne (P1B_m \rightarrow L80P, P1C_m \rightarrow D113N) bzw. der LZ-Domäne (P1D_m \rightarrow R319Q) (Abbildung 19).

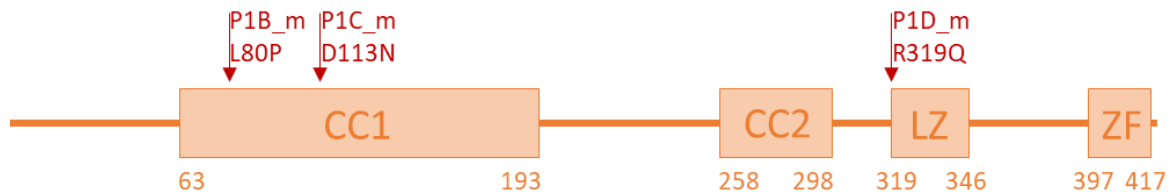


Abbildung 19. Schematische Darstellung des NEMO-Proteins von P1B_m, P1C_m und P1D_m. Die Wildtyp-AS-Sequenz von NEMO (NP_001093327.1) umfasst 419 AS mit vier funktionellen Domänen (CC1, CC2, LZ und ZF). Die *IKBKG*-Mutationen der Patienten führen zu einem AS-Austausch in der CC1-Domäne (P1B_m → L80P, P1C_m → D113N) und der LZ-Domäne (P1D_m → R319Q). CC, Coiled-coil; LZ, Leuzinzipper; ZF, Zinkfinger.

Der Einfluss der veränderten AS-Sequenz auf die Proteinexpression wurde mit Hilfe einer intrazellulären NEMO-Färbung überprüft. P1B_m präsentierte sowohl in T-Zellen als auch in Monozyten eine verminderte Expression, P1C_m sowie P1D_m zeigten keine eingeschränkte NEMO-Expression (Abbildung 20).

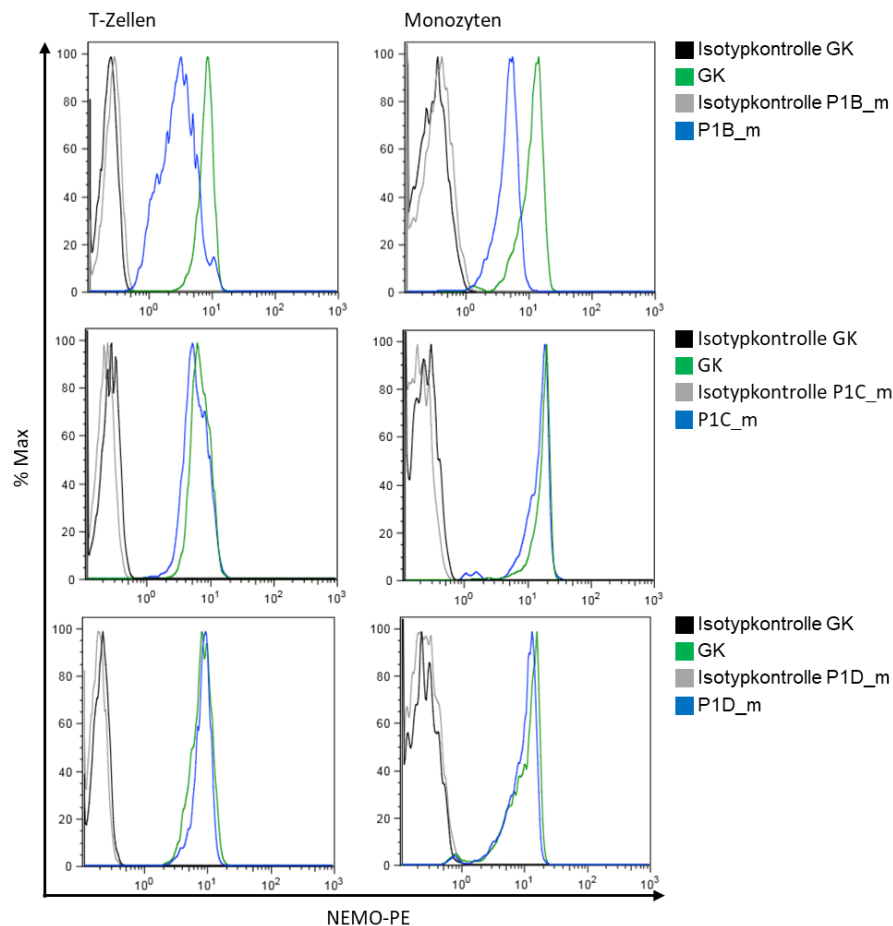


Abbildung 20. Intrazelluläre Färbung von NEMO in T-Zellen und Monozyten von P1B_m, P1C_m und P1D_m. Die Detektion des Proteins erfolgte mit Hilfe eines PE-gekoppelten NEMO-spezifischen Aκs gegen den AS-Bereich 278 – 396. Die NEMO-Expression wurde in zwei Zellpopulationen (T-Zellen links, Monozyten rechts) bestimmt. Die Proteinexpression der Patienten (P1B_m, P1C_m und P1D_m, blau) wurde im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle (GK, grün) dargestellt und mit einem negativen Kontrollansatz verglichen (Isotypkontrolle, GK in schwarz, Patienten in grau). CD, Cluster of differentiation; PE, Phycoerythrin.

7.1.10. Zusammenfassung - Immunologischer und klinischer Phänotyp von P1A_m, P1B_m, P1C_m und P1D_m

Der Patient P1A_m präsentierte einen NEMO-Defekt-spezifischen immunologischen Phänotyp (verminderte Anzahl an klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen, niedriges IgM, stark verminderte Produktion von IL-6 und IL-10 nach Stimulation mit TLR-Agonisten, IL-1 β oder TNF- α) inklusive T-Zelldefekt (verminderte Anzahl an Gedächtnis-T-Zellen, verminderte T-Zellproliferation), der auf eine *IKBKG*-Mutation mit Exon-9-Deletion und Verlust der funktionellen C-terminalen ZF-Domäne zurückgeführt werden konnte. Die Patienten P1B_m und P1C_m wiesen lediglich eine Hypogammaglobulinämie, eine eingeschränkte Produktion an Polysaccharid-spezifischen Ak sowie eine verminderte IL-6-Produktion auf. P1B_m präsentierte zusätzlich eine verminderte IL-10-Produktion nach TNF- α -Stimulation. P1D_m zeigte eine Reduktion der klassengewechselten B-Gedächtniszellen und naiven T-Zellen sowie eine eingeschränkte Produktion an Polysaccharid-spezifischen Ak und IL-10. Diese immunologischen Phänotypen konnten auf Mutationen in der NEMO-kodierenden Sequenz zurückgeführt werden (P1B_m \rightarrow c. T239C, p.L80P; P1C_m \rightarrow c. G337A, p. D113N; P1D_m \rightarrow c. G956A, p. R319Q). Die Analyse des immunologischen Phänotyps und die Gegenüberstellung der jeweiligen klinischen Verläufe (P1A_m \rightarrow Sepsis, PJP, Osteomyelitis; P1B_m \rightarrow EDA, Pneumonien und Herpesläsionen, P1C_m \rightarrow Pneumonien, Herpesläsionen; P1D_m \rightarrow Lymphknotenabszess, Pneumonien, EBV-Infektion, V.a. mykobakterielle Infektion) deuteten bei P1A_m auf einen NEMO-Defekt mit schwerem klinischen Verlauf durch Einschränkungen sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort hin.

7.2. Immunologischer und klinischer Phänotyp von Patienten mit anti-IL-6-AAk

7.2.1. Identifizierung von spezifischen anti-IL-6-AAk in einem zuvor gesunden Patienten mit schwerer Lobärpneumonie

Der bisher gesunde Patient P1 stellte sich im Alter von 5 ⁴/₁₂ Jahren mit Fieber (bis 41 °C) und schwerer Atemnot vor. Trotz zusätzlicher Sauerstoffzufuhr wies er nur eine Sauerstoffsättigung von 77 % auf. Leukozyten (10,4 G/l) und CrP (2,7 mg/l) lagen im Normbereich, während die Thrombozyten (68 G/l) stark vermindert waren. In der Röntgen-Thorax-Aufnahme zeigte sich eine schwere Lobärpneumonie mit Beteiligung des rechten Mittel- und Oberlappens (Abbildung 21A). Im Pleurapunktat wuchs *Streptococcus pneumoniae*. P1 wurde mit Antibiotika behandelt und erhielt aufgrund der wiederkehrenden Pleuraergüsse (CT-Aufnahme nach 1-monatigem stationären Aufenthalt, Abbildung 21B) mehrfache Thoraxdrainagen. Da keine Besserung eintrat, erfolgte eine Resektion der betroffenen Lungensegmente S II, S IV und S V (Abbildung 21C) (Fallbericht P1, Appendix).

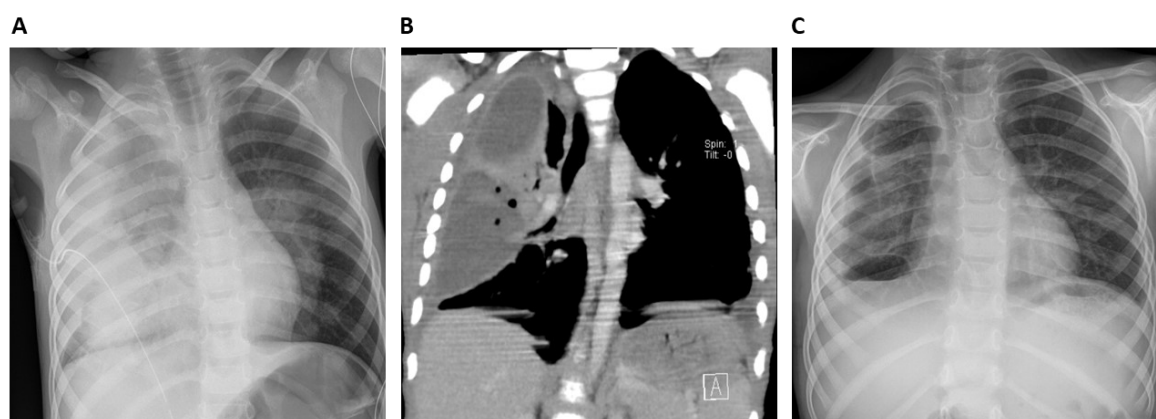
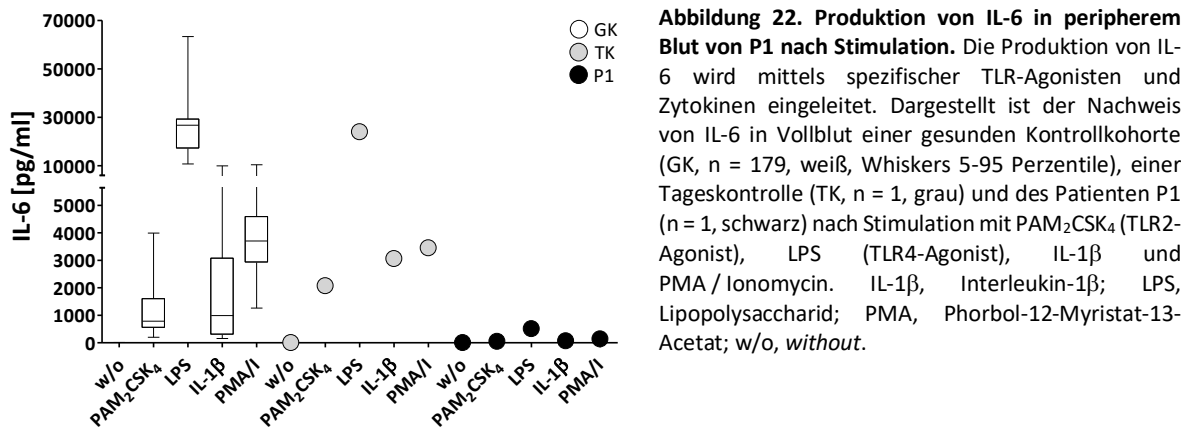


Abbildung 21. Röntgen-Thorax- und CT-Aufnahme des Patienten P1. (A) Röntgen-Thorax-Aufnahme bei stationärer Aufnahme des Patienten mit rechtsseitiger Pneumonie und Empyem. (B) CT-Thorax-Aufnahme nach 1-monatigem stationären Aufenthalt des Patienten. (C) Röntgen-Thorax-Aufnahme nach Resektion der Lungensegmente S II, S IV und S V. CT, Computertomographie.

Trotz der fulminanten bakteriellen Infektion (Thrombozyten im Verlauf auf 24 G/l abgefallen, Procalcitonin 2,63 µg/l) zeigte P1 keinen Anstieg der Akut-Phase Parameter IL-6 (< 5 pg/ml) und CrP (< 5 mg/l, max. 7,6 mg/l). Die Schwere der Erkrankung und der immunologische Phänotyp waren verdächtig für einen PID. Um diese Verdachtsdiagnose zu überprüfen, wurde die Produktion von IL-6 nach Einsatz verschiedener TLR-Agonisten (PAM₂CSK₄ → TLR2/TLR6-Agonist, LPS → TLR4-Agonist) und IL-1β in peripherem Blut des Patienten bestimmt. Die IL-6-Konzentration war in allen Stimulationsansätzen stark vermindert (Abbildung 22).



Um die IL-6-Produktion durch PBMCs zu untersuchen, wurde ein Cross-Over-Experiment mit PBMCs und Serum von einem gesunden Spender und P1 durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden PBMCs des gesunden Spenders mit autologem Serum bzw. mit Serum von P1 inkubiert und die IL-6-Konzentration nach Stimulation mit IL-1β, PAM₂CSK₄ und LPS bestimmt. Während die IL-6-Konzentrationen im Kulturüberstand mit autologem Serum hoch waren, konnten nur sehr geringe Mengen an IL-6 in den Stimulationen mit Patientenserum gemessen werden (Abbildung 23A). Im zweiten Ansatz wurden PBMCs des Patienten P1 mit autologem Patientenserum bzw. mit Serum der gesunden Kontrolle inkubiert und die IL-6-Konzentration nach Stimulation bestimmt. Die Kombination aus Patienten-PBMCs und gesundem Spenderserum wies hohe Konzentrationen an IL-6 im Überstand auf. Die Kombination aus Patienten-PBMCs mit autologem Patientenserum zeigte nach Stimulation nur eine geringe Menge an IL-6 im Kulturüberstand (Abbildung 23B).

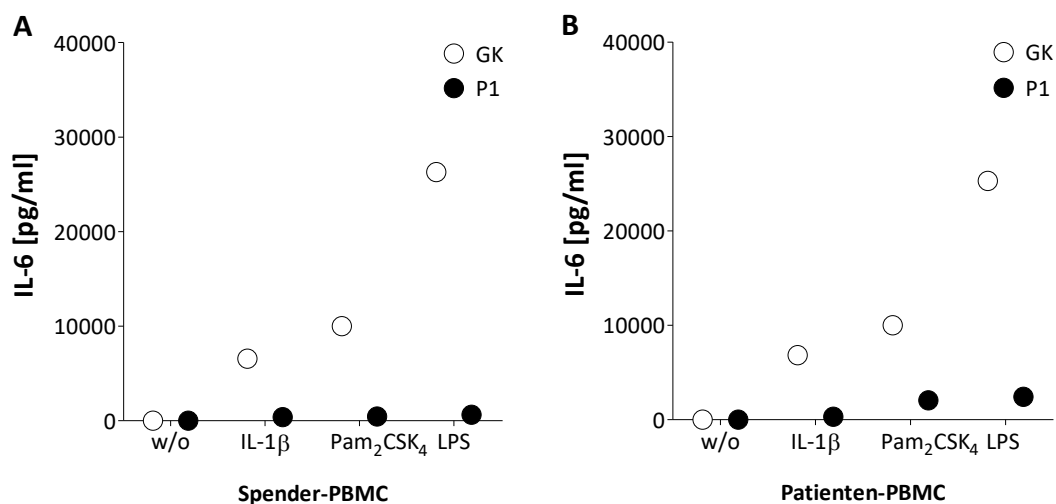


Abbildung 23. Quantitativer Nachweis von IL-6 im Überstand (Cross-Over-Experiment). Die Produktion von IL-6 wurde mittels spezifischer TLR-Agonisten und IL-1β aktiviert. (A) Nachweis von IL-6 im Überstand von gesunden Spender-PBMCs nach Stimulation mit IL-1β (IL-1R-Agonist), PAM₂CSK₄ (TLR2/TLR6-Agonist) und LPS (TLR4-Agonist) nach Kultivierung mit autologem Serum (weiß) bzw. Patientenserum (schwarz). (B) Nachweis von IL-6 im Überstand von Patienten-PBMCs nach Stimulation mit IL-1β (IL-1R-Agonist), PAM₂CSK₄ (TLR2/TLR6-Agonist) und LPS (TLR4-Agonist) nach Kultivierung mit gesundem Spenderserum (weiß) bzw. Patientenserum (schwarz). IL-6, Interleukin-6; LPS, Lipopolysaccharid; PBMC, Peripheral blood mononuclear cell; w/o, without.

Die Resultate schlossen einen Defekt in der IL-6-Produktion aus und deuteten auf einen inhibierenden Faktor im Serum des Patienten hin. Mit Hilfe eines anti-IL-6-IgG-Sandwich-ELISAs wurde die Anwesenheit von anti-IL-6-AAk im Serum des Patienten bestätigt. Die Spezifität dieser AAK wurde durch Serum-Vorinkubation mit rekombinanten hIL-6 bestimmt. Die detektierten anti-IL-6-IgG-AAk zeigten mit IL-6-Vorinkubation eine Reduzierung des ELISA-Signals um 88,5 % (Verdünnung 1:100; 3,889 OD_{540nm} → 0,447 OD_{540nm}) (Abbildung 24).

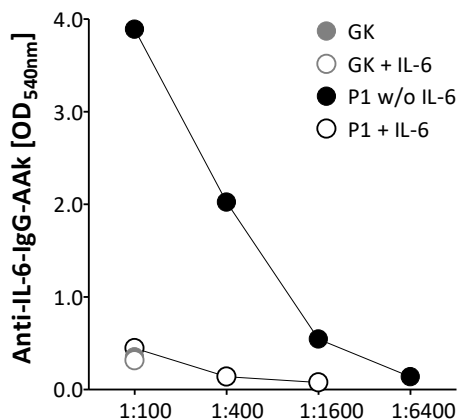


Abbildung 24. Spezifischer anti-IL-6-IgG-Sandwich-ELISA von P1. Die Darstellung der Signale erfolgt in der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 540nm (OD_{540nm}). Die Spezifität wurde durch Vorinkubation mit rekombinanten hIL-6 überprüft (nicht gefüllte Kreise). Eine Signalreduktion um $\geq 50\%$ wurde als IL-6-spezifisch definiert. Das Serum der gesunden Kontrolle (GK, grau) und des Patienten (P1, schwarz) wurde 1:100, 1:400, 1:1600 und 1:6400 verdünnt. ELISA, *Enzyme-linked immunosorbent assay*; hIL-6, Humanes Interleukin-6.

7.2.2. Suche nach anti-IL-6-AAk in Patientenkohorten und Kontrollkohorten

Anschließend erfolgte die Suche nach anti-IL-6-AAk in einer definierten Patientenkohorte (Patientenkohorte 1, PK1, Patienten mit bakteriellen Infektionen, n = 349, inklusive P1). Da AAK gegen IL-6 auch in Patienten mit APS Typ 1 / APECED-Syndrom sowie in Patienten mit Thymomerkkrankungen beschrieben wurden, wurde zusätzlich eine Patientenkohorte mit Autoimmunerkrankungen (PK2, n = 564) auf die Präsenz von anti-IL-6-AAk untersucht. Als dritte Patientenkohorte wurden Patienten mit mykobakteriellen Infektionen (PK3, n = 366) analysiert. Als Kontrollkohorten dienten drei Gruppen bei denen keine bakteriellen Infektionen aufgetreten waren (Kontrollkohorte 1-3, KK1-3, n = 988): KK1 - gesunde Individuen deren Impfantikörpertiter-Status überprüft wurde (n = 405), KK2 - jugendliche Individuen mit Übergewicht (n = 455) und KK3 - Individuen mit Hypothyreose (n = 128). Das Screening der Kohorten PK1, PK3 und KK1-3 erfolgte mit einem anti-IL-6-IgG-Sandwich-ELISA. Die Signale der einzelnen Kohorten sind als Prozent gegenüber einer internen positiven Kontrolle dargestellt (Abbildung 25). Patienten mit einer Signalstärke von $\geq 50\%$ wurden im Screening als anti-IL-6-AAk-positiv definiert. Das Screening von PK2 erfolgte unter Anwendung eines anti-IL-6-AAk Bio-Plex-Assays an dem *National Institute of Health* (NIH / NIAID, USA) unter der Leitung von Dr. Steven M. Holland [180]. Patienten mit einer Bindungsaktivität über den ermittelten Referenzwert von 1118,1 (*mean fluorescence intensity*, MFI; Kontrollkohorte, n = 333, Daten nicht gezeigt) wurden als anti-IL-6-AAk-positiv definiert.

Die Spezifität wurde durch Vorinkubation mit rekombinanten hIL-6 überprüft. Eine Reduktion des ursprünglichen anti-IL-6-AAk-ELISA-Signals um $\geq 50\%$ galt als IL-6-spezifisch.

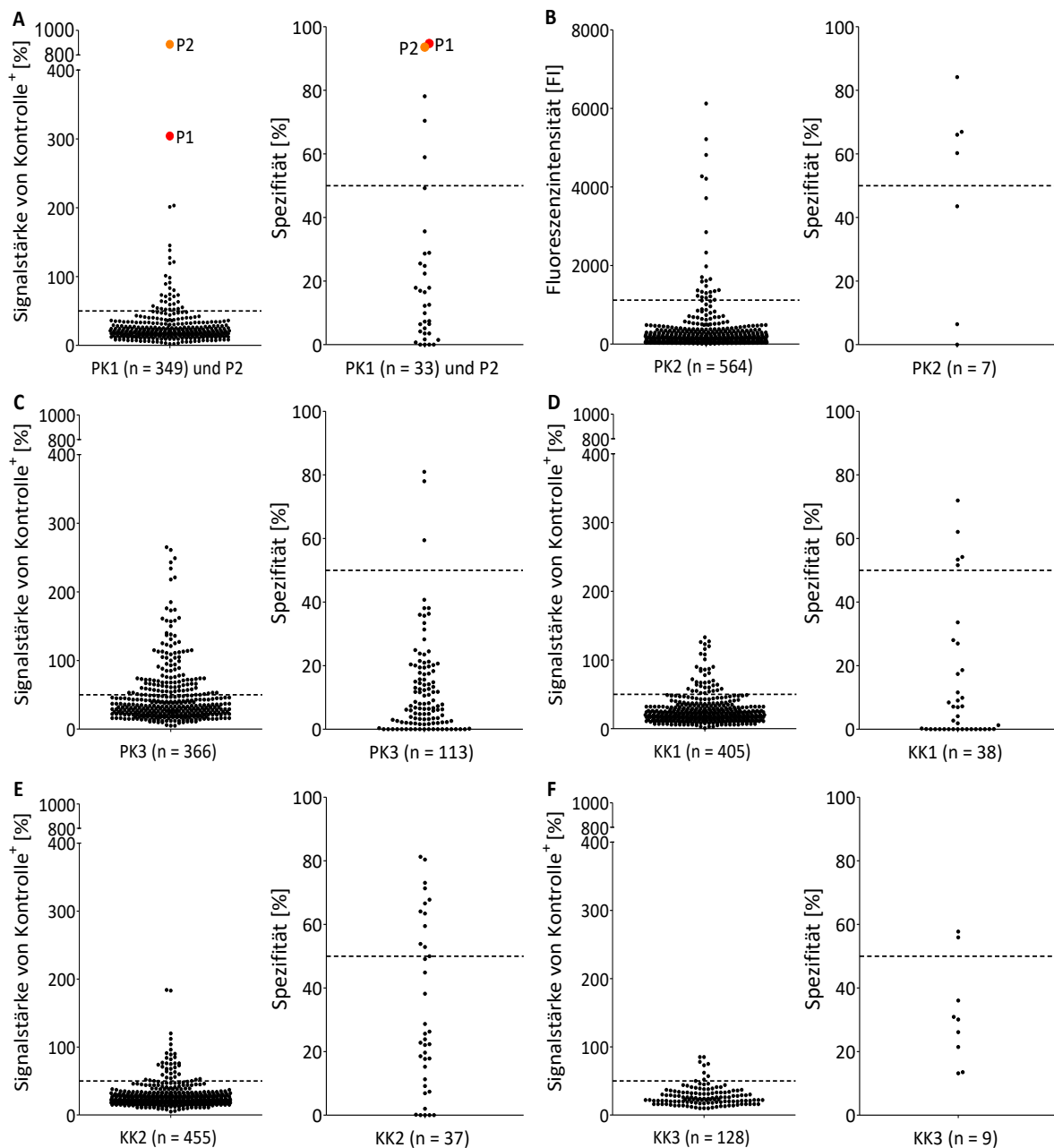


Abbildung 25. Anti-IL-6-AAk-Screening und Bestimmung der IL-6-Spezifität. Die Analyse erfolgte mit einem anti-IL-6-IgG-AAk-ELISA. Die Darstellung der Signale erfolgt in Prozent zu einer internen positiven Kontrolle. Signalstärken $\geq 50\%$ wurden als anti-IL-6-AAk-positiv definiert. PK2 wurde über einen anti-IL-6-AAk Bio-Plex-Assay gescreent. Bindungsaktivitäten über dem Referenzwert von 1118,1 (Kontrollkohorte $n = 333$) wurden als anti-IL-6-AAk-positiv definiert. Die Spezifität wurde durch Vorinkubation mit rekombinanten hIL-6 überprüft. Eine Signalreduktion von $\geq 50\%$ wurde als IL-6-spezifisch definiert. (A) AAK-Screening und Spezifität in PK1 ($n = 349$). (B) AAK-Screening und Spezifität in PK2 ($n = 564$). (C) AAK-Screening und Spezifität in PK3 ($n = 366$). (D) AAK-Screening und Spezifität in KK1 ($n = 405$). (E) AAK-Screening und Spezifität in KK2 ($n = 455$). (F) AAK-Screening und Spezifität in KK3 ($n = 128$). ELISA, *Enzyme-linked immunosorbent assay*; hIL-6, Humanes Interleukin-6; KK, Kontrollkohorte; PK, Patientenkohorte.

Innerhalb der PK1 lagen 33 Patienten (33/349, 9,5 %) über dem Referenzbereich der internen Kontrolle, jedoch nur vier Patienten (inklusive P1) besaßen einen spezifischen anti-IL-6-AAk (4/349, 1,1 %). Zusätzlich zu der PK1 wurde Material vom erst-beschriebenen anti-IL-6-AAk-Patienten (Patient 2, P2) [114] (Fallbericht, Appendix) analysiert und der AAK-Titer sowie die IL-6-Spezifität bestimmt (Abbildung 25A). In PK2 wiesen 25 Patienten (25/564, 4,4 %) AAK mit einer erhöhten IL-6-Bindungsaktivität auf. Nur von sieben Patienten konnte Material auf dessen IL-6-Spezifität getestet werden. Vier Patienten besaßen hoch-titrige, spezifische AAK gegen IL-6 (4/546, 0,7 %) (Abbildung 25B). 113 Patienten aus PK3 zeigten ein hohes anti-IL-6-AAk Signal (113/366, 30,9 %). Davon besaßen drei Patienten spezifische AAK gegen IL-6 (3/366, 0,8 %) (Abbildung 25C). Innerhalb der Kontrollkohorten (KK) zeigten 38 Individuen aus KK1 (38/495, 9,4 %), 37 Individuen aus KK2 (37/455, 8,1 %) und neun Individuen aus KK3 (9/128, 7,0 %) einen erhöhten AAK-Titer. Die Spezifität konnte jedoch nur in fünf Individuen aus KK1 (5/405, 1,2 %), 12 Individuen aus KK2 (12/455, 2,6 %) und zwei Individuen aus KK3 (2/128, 1,6 %) bestätigt werden (Abbildung 25D-F).

7.2.3. Überprüfung der neutralisierenden Wirkung von anti-IL-6-AAk durch Messung der STAT3-Phosphorylierung in humanen CD4⁺ T-Zellen

Mittels *in vitro* durchgeführter IL-6-Stimulation wurde überprüft, ob es sich bei den detektierten anti-IL-6-AAk um Ak mit neutralisierendem Effekt handelt. Hierfür wurde die STAT3-Phosphorylierung nach Stimulation mit IL-6 (1 und 10 ng/ml) in CD4⁺ T-Zellen eines gesunden Spenders in Verbindung mit autologem Serum bzw. Serum von anti-IL-6-AAk-positiven Patienten bestimmt. Als Kontrollansatz diente eine IL-10-Stimulation, deren Phosphorylierungssignal als 100 % definiert wurde.

Zwei von den zuvor vier Patienten aus der Kohorte PK1 zeigten eine verminderte Phosphorylierung von STAT3 nach Stimulation mit IL-6 (P1 → 0,8 % 1 ng/ml IL-6 bzw. 5 % 10 ng/ml IL-6, P3 → 4,6 % 1 ng/ml IL-6 bzw. 0,3 % 10 ng/ml IL-6). P3 ist ein 2-jähriges Mädchen, welches unter einem submandibulären Abszess ohne Akut-Phase-Antwort (CrP < 0,03 mg/dl) und im späteren Verlauf unter einer schmerzenden septischen Arthritis durch *S. pyogenes* litt (Fallbericht, Appendix). Der neutralisierende Effekt der anti-IL-6-AAk von P2 (0,0 % 1 und 10 ng/ml IL-6) wurde ebenfalls bestätigt. Zwei von den vier PK2-Patienten präsentierten eine reduzierte (P4 → 6,2 % 1 ng/ml IL-6 bzw. 31,5 % 10 ng/ml IL-6) bzw. komplett absente (P5 → 0,0 % 1 und 10 ng/ml IL-6) STAT3-Phosphorylierung nach Einsatz von IL-6. P4 ist ein 50-jähriger Mann mit APECED-Syndrom (Fallbericht, Appendix). P5 ist eine 53-jährige Patientin mit einem metastatischen Thymom und einer positiven Myasthenia Gravis Diagnose (Fallbericht, Appendix). Die hoch-titrigen, spezifischen anti-IL-6-AAk der drei Patienten aus der Patientenkohorte PK3 (mykobakterielle Infektionen) zeigten keinen neutralisierenden Effekt (Abbildung 26A).

Aufgrund von Materialmangel konnten nur vier anti-IL-6-AAk-positive Individuen aus KK1 untersucht werden, von denen keiner eine neutralisierende Wirkung auf die STAT3-Phosphorylierung nach IL-6-Stimulation zeigte. Ein Individuum von den 12 anti-IL-6-AAk-positiven Individuen aus KK2 (Jugendliche mit Übergewicht) präsentierte eine verminderte Phosphorylierung von STAT3 (KK2-1 → 0,3 % 1 ng/ml IL-6 bzw. 56,8 % 10 ng/ml IL-6). Seine hier verwendete Serumprobe wurde im Alter von 14 ¹⁰/₁₂ Jahren abgenommen. Von den zwei anti-IL-6-AAk-positiven Individuen aus KK3 (Individuen mit Hypothyreose) konnte nur ein Teilnehmer aufgrund von Materialmangel untersucht werden. Dieser zeigte keine Beeinträchtigung der STAT3-Phosphorylierung (Abbildung 26B).

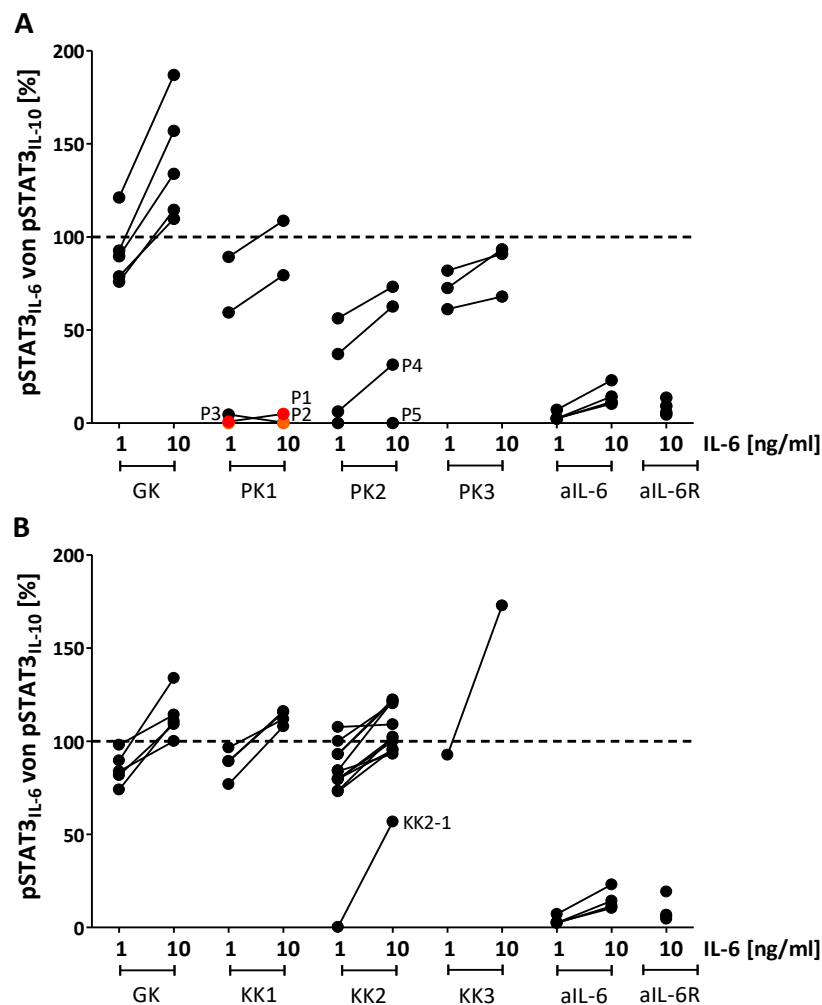


Abbildung 26. STAT3-Phosphorylierung in CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation. Um den neutralisierenden Effekt der detektierten anti-IL-6-AAk zu bestimmen, wurde die Phosphorylierung von STAT3 nach Stimulation mit IL-6 (1 und 10 ng/ml) in CD4⁺ T-Zellen eines gesunden Spenders überprüft. Als positive Referenz diente ein Stimulationsansatz mit IL-10 (10 ng/ml), der als 100 % definiert wurde (siehe gestrichelte schwarze Linie). Zusätzlich wurden gesunde Spender ohne nachweislichen Ak-Titer (GK, n = 5), ein kommerzieller anti-IL-6-Ak (n = 4) und ein anti-IL-6R-Ak (n = 4) als Kontrollen eingesetzt. (A) STAT3-Phosphorylierung in den Patientenkohorten PK1-3. Der Patient P1 ist in rot dargestellt. Der Patient P2 ist in orange wiedergegeben. (B) STAT3-Phosphorylierung in den Kontrollkohorten KK1-3. Ak, Antikörper; KK, Kontrollkohorte; P, Patient; pSTAT3, Phosphoryliertes STAT3-Signal; STAT3, *Signal transducer and activator of transcription 3*.

7.2.4. Phosphorylierung von STAT3 in murinen Ba/F3-Zelllinien zur Analyse des klassischen / trans IL-6-Signalwegs

Anhand seiner di-Heterotrimer-bildenden Komponenten (IL-6, IL-6R und gp130) wird der IL-6-Signalweg in zwei Varianten differenziert, den klassischen (mIL-6R-abhängig, anti-inflammatorisch wirkend) und den trans (sIL-6R-abhängig, pro-inflammatorisch wirkend) IL-6-Signalweg. Um die Auswirkung der anti-IL-6-AAk auf die di-heterotrimere Komplexbildung zu betrachten, wurden murine pro-B-Zelllinien (Ba/F3) mit humanen IL-6-Rezeptoren (gp130 → Ba/F3-gp130; gp130/IL-6R → Ba/F3-gp130/IL-6R) verwendet. Die intrazelluläre STAT3-Phosphorylierung wurde nach Stimulation mit IL-6 (0, 0,2, 1, 5, 25, 125 und 625 ng/ml) bestimmt und der Anteil der phosphorylierten Zellen mit dem maximalen Phosphorylierungsansatz nach Einsatz von 625 ng/ml IL-6 prozentual verglichen. Um eine Hemmung der IL-6-Signalkaskade durch die löslichen Faktoren sgp130 und sIL-6R im Serum der anti-IL-6-AAk-positiven Patienten bzw. Individuen auszuschließen, wurden diese im Vorfeld bestimmt. Die Konzentration der Faktoren war bei allen Patienten / Individuen unauffällig (Tabelle 36).

Tabelle 36. Quantitative Bestimmung der löslichen Faktoren sgp130 und sIL-6R mittels ELISA (CAU)

Patient / Individuum	sIL-6R [ng/ml]	sgp130 [ng/ml]
P1	69,5	244
P2	38,3	296
P3	39,8	299
P4	35,4	208
P5	43,3	239
KK2-1	59,9	245
Referenzbereich	50-75	250-400

KK2, Individuum aus Kontrollkohorte 2; P, Patient; sgp130, Lösliches Glykoprotein 130; sIL-6R, Löslicher IL-6-Rezeptor

Die Anwesenheit von anti-IL-6-AAk führte zur Hemmung beider Signalwege (Abbildung 27). Anhand dieser Ergebnisse konnte die selektive Hemmung eines IL-6-Signalwegs durch anti-IL-6-AAk von Patienten bzw. gesunden Individuen ausgeschlossen werden.

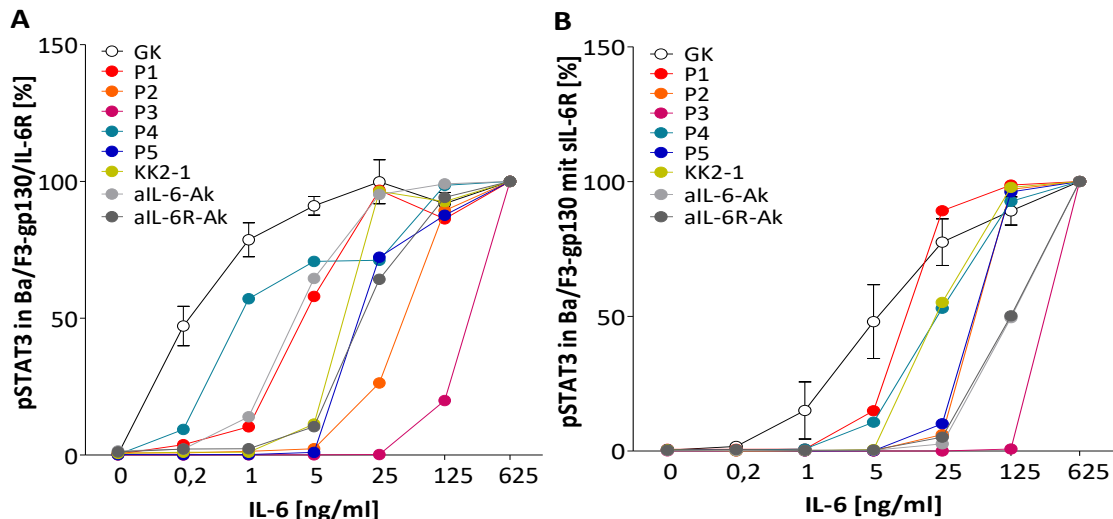


Abbildung 27. STAT3-Phosphorylierung in murinen pro-B-Zellen nach Stimulation. Mit Hilfe der Zelllinien Ba/F3-gp130/IL6R und Ba/F3-gp130 wurde der Effekt der anti-IL-6-AAK auf den klassischen (mIL-6R-abhängig) bzw. trans (sIL-6R-abhängig) IL-6-Signalweg betrachtet. Die STAT3-Phosphorylierung wurde nach Stimulation mit IL-6 bestimmt und der Anteil der phosphorylierten Zellen mit dem maximalen Phosphorylierungssignal nach Einsatz von 625 ng/ml IL-6 (entspricht 100 %) verglichen. Als Kontrolle wurden gesunde Spender ohne nachweislichen AAK-Titer (GK, n = 4, schwarz), ein kommerzieller anti-IL-6-Ak (n = 1, hellgrau) und ein anti-IL-6R-Ak (n = 1, dunkelgrau) eingesetzt. (A) STAT3-Phosphorylierung in Ba/F3-gp130/IL-6R Zellen (klassisch) nach Stimulation mit IL-6. (B) STAT3-Phosphorylierung in Ba/F3-gp130 Zellen (trans) nach Stimulation mit IL-6 und Zugabe eines löslichen IL-6R (sIL-6R). Ak, Antikörper, AAK, Autoantikörper; Gp, Glykoprotein; KK2-1, Individuum aus Kontrollkohorte 2; P, Patient; STAT3, *Signal transducer and activator of transcription 3*.

7.2.5. Identifizierung von neutralisierenden anti-IL-6-AAK in bisher gesunden Individuen

Aufgrund einer erhöhten IL-6-Konzentration wurde bei drei Neonaten (N1-3) eine postnatale bakterielle Infektion vermutet und eine antibiotische Therapie eingeleitet (Fallbericht, Appendix). Trotz des erhöhten IL-6-Spiegels zeigte keiner von ihnen eine gesteigerte CrP-Konzentration, sodass eine Beeinträchtigung der Akut-Phase-Reaktion durch einen inhibitorischen Faktor vermutet wurde (Abbildung 28).

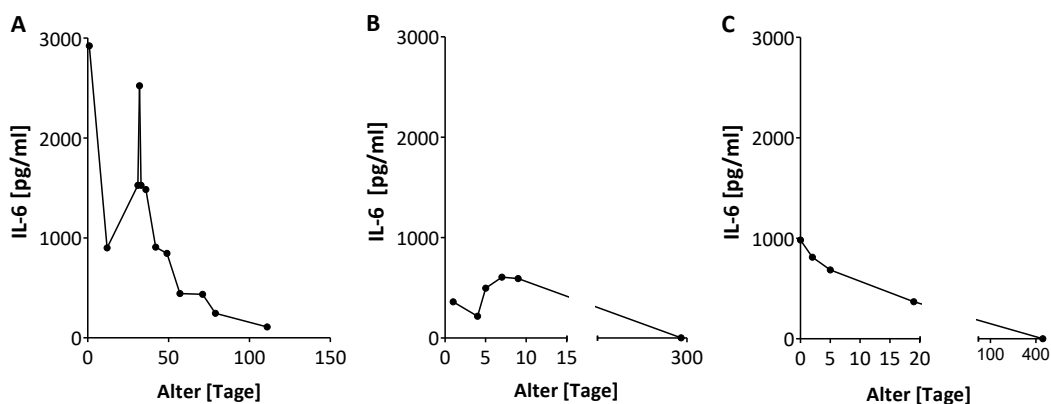


Abbildung 28. IL-6-Konzentration von N1-3 im zeitlichen Verlauf. Die Konzentration von IL-6 wurde bei N1-3 direkt nach der Geburt bestimmt und im Verlauf kontrolliert. Der erneute Anstieg bei N1 und N2 ist auf eine Rotavirus-Infektion zurückzuführen. (A) IL-6-Konzentration von N1. (B) IL-6-Konzentration von N2. (C) IL-6-Konzentration von N3. IL-6, Interleukin-6; N, Neonat.

Daraufhin wurden N1-3 als auch die dazugehörigen Mütter (MN1-3) auf die Anwesenheit von anti-IL-6-AAk untersucht. Bei den Müttern waren bisher keine schweren bakteriellen Infektionen aufgetreten. MN1, MN2, MN3, N1 und N2 präsentierten einen hohen Titer an spezifischen anti-IL-6-IgG-AAk (Abbildung 29). Eine *in utero* Sensibilisierung der Mütter gegen eine veränderte IL-6-Struktur der Neonaten während der Schwangerschaft (in Analogie zur Rhesusinkompatibilität als Auslöser für eine AAK-Produktion) wurde durch den Nachweis identischer IL-6-kodierender Sequenzen ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).

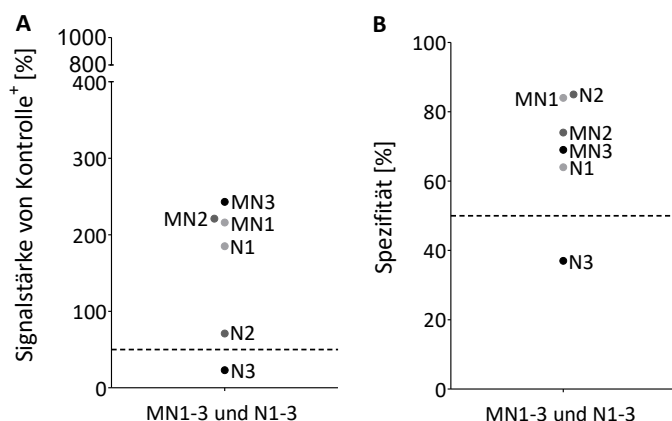


Abbildung 29. Anti-IL-6-AAk- und Spezifitätsscreening in MN1-3 und N1-3. Die Analyse der Mütter MN1-3 sowie der Neonaten N1-3 erfolgte mit einem anti-IL-6-IgG-Ak-ELISA. (A) Die Darstellung der Titer erfolgt in Prozent zu einer internen positiven Kontrolle. Signalstärken ≥ 50 % wurden als anti-IL-6-AAk-positiv definiert. (B) Die Spezifität wurde durch Vorinkubation mit rekombinantem hIL-6 überprüft. Eine Signalreduktion um ≥ 50 % wurde als IL-6-spezifisch definiert. hIL-6, Humanes IL-6; MN, Mutter von Neonat, N, Neonat.

Im Folgenden wurde der neutralisierende Effekt der anti-IL-6-AAk von MN1-3 auf die IL-6-Signalkaskade überprüft. CD4⁺ T-Zellen eines gesunden Spenders wurden mit IL-6 (1 und 10 ng/ml) stimuliert und die intrazelluläre STAT3-Phosphorylierung in Verbindung mit Serum quantitativ bestimmt. Das Phosphorylierungssignal von STAT3 nach Stimulation mit IL-10 wurde als positive Referenz mit 100 % definiert. Die Mütter (MN1-3) zeigten alle eine verminderte STAT3-Phosphorylierung nach Stimulation mit IL-6 (MN1 \rightarrow 0,4 % 1 ng/ml IL-6 bzw. 11,9 % 10 ng/ml IL-6, MN2 \rightarrow 6,6 % 1 ng/ml IL-6 bzw. 45,6 % 10 ng/ml IL-6, MN3 \rightarrow 0,0 % 1 ng/ml IL-6 bzw. 8,0 % 10 ng/ml IL-6) (Abbildung 30).

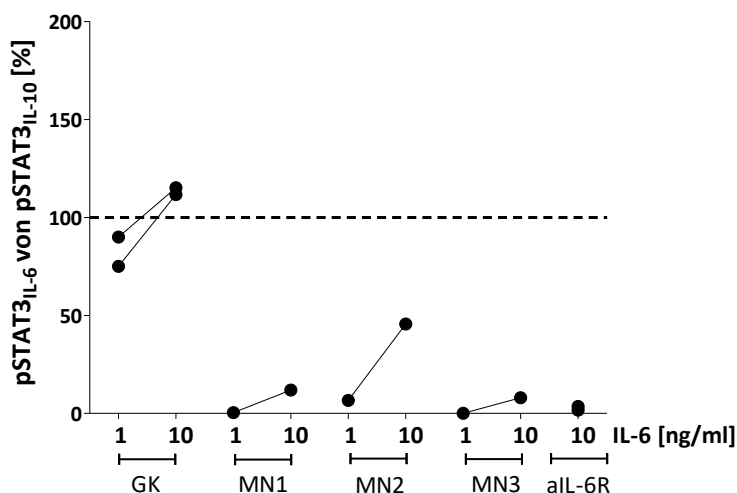


Abbildung 30. STAT3-Phosphorylierung von MN1-3 in CD4⁺T-Zellen nach Stimulation. Der neutralisierende Effekt der anti-IL-6-AAk wurde mit Hilfe der STAT3-Phosphorylierung in CD4⁺ T-Zellen eines gesunden Spenders nach Stimulation mit IL-6 (1 und 10 ng/ml) quantitativ bestimmt. Als positive Referenz diente ein Stimulationsansatz mit IL-10 (10 ng/ml), der als 100 % definiert wurde (siehe gestrichelte schwarze Linie). Zusätzlich wurden gesunde Spender ohne nachweislichen AAK-Titer (GK, n = 2) und ein anti-IL-6R-Ak (aIL-6R, n = 2) als Kontrollen eingesetzt. MN, Mutter von Neonat.

Die Auswirkung der AAK auf die hexamere IL-6-Signalkomplexbildung wurde unter Anwendung der murinen pro-B-Zelllinien Ba/F3-gp130 und Ba/F3-gp130/IL-6R analysiert. Die intrazelluläre Phosphorylierung von STAT3 wurde nach Stimulation mit IL-6 (0, 0,2, 1, 5, 25, 125 und 625 ng/ml) bestimmt. Die phosphorylierten Zellen wurden prozentual mit dem maximalen Phosphorylierungsansatz (625 ng/ml IL-6) verglichen. Zuvor wurden die löslichen Faktoren sgp130 und sIL-6R im Serum von MN1-3 quantitativ bestimmt. Die Konzentration der Faktoren war unauffällig (Tabelle 37).

Tabelle 37. Quantitative Bestimmung der löslichen Faktoren sgp130 und sIL-6R mittels ELISA von MN1-3 (CAU)

Patient / Individuum	sIL-6R [ng/ml]	sgp130 [ng/ml]
MN1	48,0	241
MN2	34,9	211
MN3	62,3	242
Referenzbereich	50-75	250-400

MN, Mutter von Neonat; sgp130, Lösliches Glykoprotein 130; sIL-6R, Löslicher IL-6-Rezeptor

Die AAK der Mütter inhibierten sowohl den klassischen (Abbildung 31A) als auch den trans IL-6-Signalweg (Abbildung 31B).

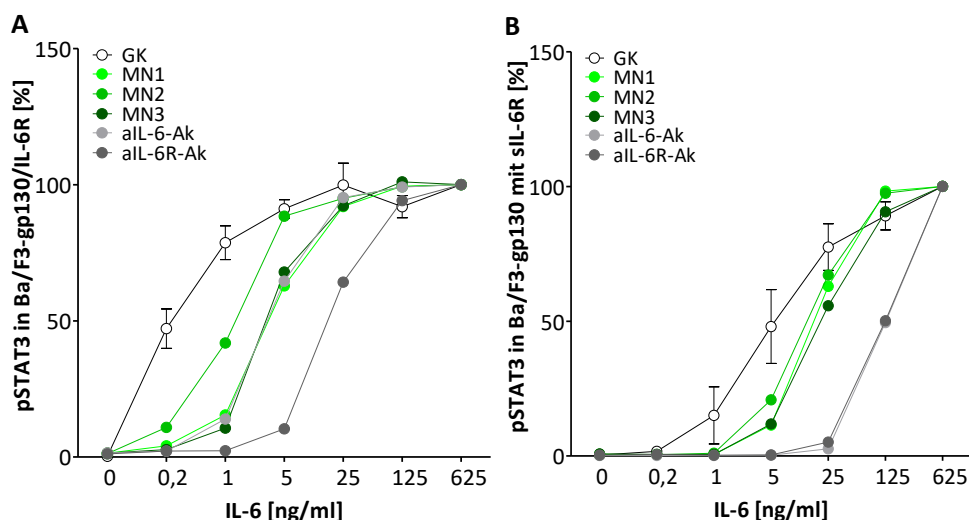


Abbildung 31. STAT3-Phosphorylierung von MN1-3 in murinen pro-B-Zellen zur Analyse des klassischen und trans IL-6-Signalwegs. Der neutralisierende Effekt auf den klassischen (mIL-6R-abhängig) bzw. trans (sIL-6R-abhängig) IL-6-Signalweg wurde mit Hilfe der Zelllinien Ba/F3-gp130/IL6R und Ba/F3-gp130 überprüft. Die Bestimmung der STAT3-Phosphorylierung erfolgte nach Stimulation mit IL-6. Der Anteil der phosphorylierten Zellen wurde mit dem maximalen Phosphorylierungssignal nach Einsatz von 625 ng/ml IL-6 (entspricht 100 %) verglichen. Als Kontrolle wurden gesunde Spender ohne nachweislichen AAK-Titer (GK, n = 4, schwarz), ein kommerzieller anti-IL-6-Ak (n = 1, hellgrau) und ein anti-IL-6R-Ak (n = 1, dunkelgrau) eingesetzt. (A) Klassischer IL-6-Signalweg mit Ba/F3-gp130/IL-6R nach Stimulation mit IL-6. (B) Trans IL-6-Signalweg mit Ba/F3-gp130 und zugeführtem sIL-6R nach Stimulation mit IL-6. Ak, Antikörper; MN, Mutter von Neonat; pSTAT3, Phosphoryliertes STAT3 Signal.

7.2.6. Bestimmung der anti-IL-6-IgG-AAk-Subklassen

Die bisher beschriebenen anti-IL-6-AAk in Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen gehörten zu den IgG-Subklassen IgG₁ (hoch-titrig), IgG₃ (niedrig-titrig) und IgG₄ (hoch-titrig) [114, 115]. Unter Anwendung eines spezifischen anti-IL-6-IgG₁₋₄-ELISAs wurden die Subklassen der detektierten anti-IL-6-AAk bestimmt. Als negative Kontrolle diente ein gesunder Spender ohne nachweislichen AAK-Titer. P1 wies einen hohen Titer an anti-IL-6-IgG₁-AAk auf (OD_{540nm} 1,8). P2 besaß einen hohen Titer an IgG₁- (OD_{540nm} 2,2) sowie einen niedrigen Titer an IgG₄-Ak (OD_{540nm} 0,5). P3 präsentierte einen sehr hohen anti-IL-6-IgG₁-Titer (OD_{540nm} 2,8) sowie einen erhöhten Titer an IgG₄-Ak (OD_{540nm} 1,0). P4 wies einen hohen Titer an IgG₁- (OD_{540nm} 1,2) sowie einen niedrigen Titer an IgG₄-Ak (OD_{540nm} 0,5) auf. P5 besaß einen hohen Titer an IgG₁-Ak (OD_{540nm} 1,4) sowie einen niedrigen Titer an anti-IL-6-IgG₃-Ak (OD_{540nm} 0,4). Die anti-IL-6-IgG-AAk von KK2-1 zeigten eine Zugehörigkeit zu den Subklassen IgG₁ (OD_{540nm} 0,4) und IgG₄ (OD_{540nm} 0,6). Die Mütter MN1-3 besaßen hohe Titer an anti-IL-6-IgG₁-AAk (MN1 OD_{540nm} 1,8; MN2 OD_{540nm} 1,8; MN3 OD_{540nm} 3,2). MN2 wies zusätzliche einen niedrigen Titer an IgG₄-Ak (OD_{540nm} 0,6) auf. Die Neonaten N1-N3 präsentierten sich sowohl mit hohen (N1 OD_{540nm} 1,5) als auch mit niedrigen anti-IL-6-IgG₁-Ak-Titern (N2 OD_{540nm} 0,6; N3 OD_{540nm} 0,3) (Abbildung 32).

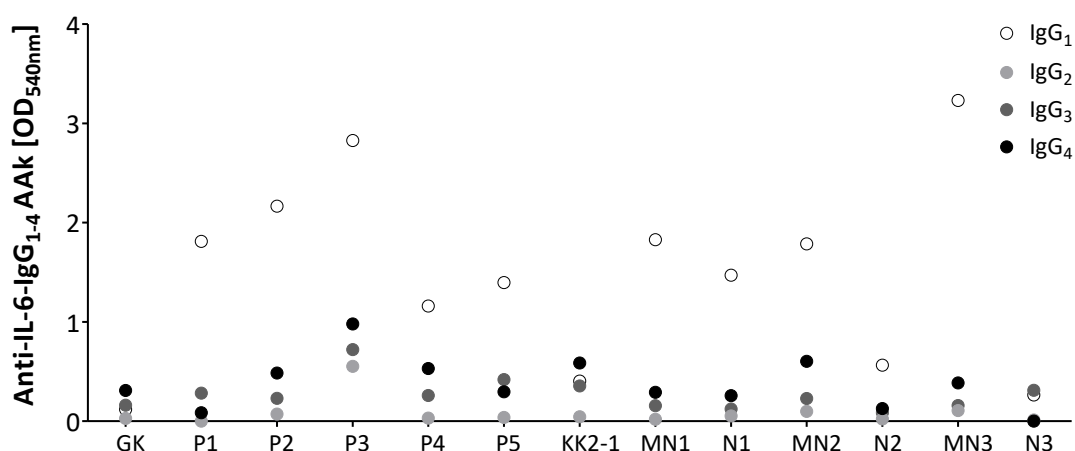


Abbildung 32. Anti-IL-6-IgG-Subklassen-ELISA. Die Darstellung der Signale erfolgt in der gemessenen optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 540 nm. Als Kontrolle wurde ein gesunder Spender ohne nachweislichen AAK-Titer eingesetzt (GK). Die Ak der einzelnen Subklasse sind wie folgt dargestellt: IgG₁ (weiß), IgG₂ (hellgrau), IgG₃ (dunkelgrau) und IgG₄ (schwarz). KK2-1, Individuum aus Kontrollkohorte 2; MN, Mutter von Neonat, N, Neonat; OD, Optische Dichte; P, Patient.

7.2.7. Ausschluss von AAK gegen weitere Zytokine in Patienten / Individuen mit anti-IL-6-AAk

Der Patient P1 (Lobärpneumonie) präsentierte zusätzlich zu dem hohen anti-IL-6-AAk-Titer (10828 MFI) einen niedrigen Titer an anti-IFN- γ -Ak (2713 MFI) (Abbildung 33A). P2 (subkutaner Abszess) (13654 MFI) und P3 (submandibulärer Abszess, septische Arthritis) (25196 MFI) wiesen einen sehr hohen AAK-Titer gegen IL-6 auf (Abbildung 33B und C). P4 (APECED-Syndrom) besaß einen hohen Titer an anti-IL-6-AAk (1299 MFI), anti-IFN- α - (8409 MFI), anti-IFN- ω - (5105 MFI), anti-IL-17F- (5557 MFI) und anti-IL-22-AAk (4479 MFI) (Abbildung 33D). P5 (Thymom) präsentierte einen hohen Titer an anti-IL-6- (4038 MFI) und anti-IL-12p70-AAk (17285 MFI) (Abbildung 33E). KK2-1 besaß keine weiteren anti-Zytokin-AAk (anti-IL-6-AAk 18711 MFI) (Abbildung 33F). MN1 zeigte zusätzlich zum hohen anti-IL-6-AAk-Titer (11708 MFI) einen leicht erhöhten Titer gegen das Zytokin IFN- γ (1941 MFI) (Abbildung 33G). N1 präsentierte einen hohen anti-IL-6-AAk-Titer (5366 MFI) sowie einen leicht erhöhten AAK-Spiegel gegen die Zytokine IFN- γ (2133 MFI), IL-15 (2764 MFI) und IL-2 (1068 MFI) (Abbildung 33H). MN2 (11127 MFI), N2 (2356 MFI), MN3 (11410 MFI) sowie N3 besaßen keine weiteren anti-Zytokin-AAk (Abbildung 33I-K). N3 präsentierte einen negativen anti-IL-6-AAk-Titer (119 MFI) (Abbildung 33L).

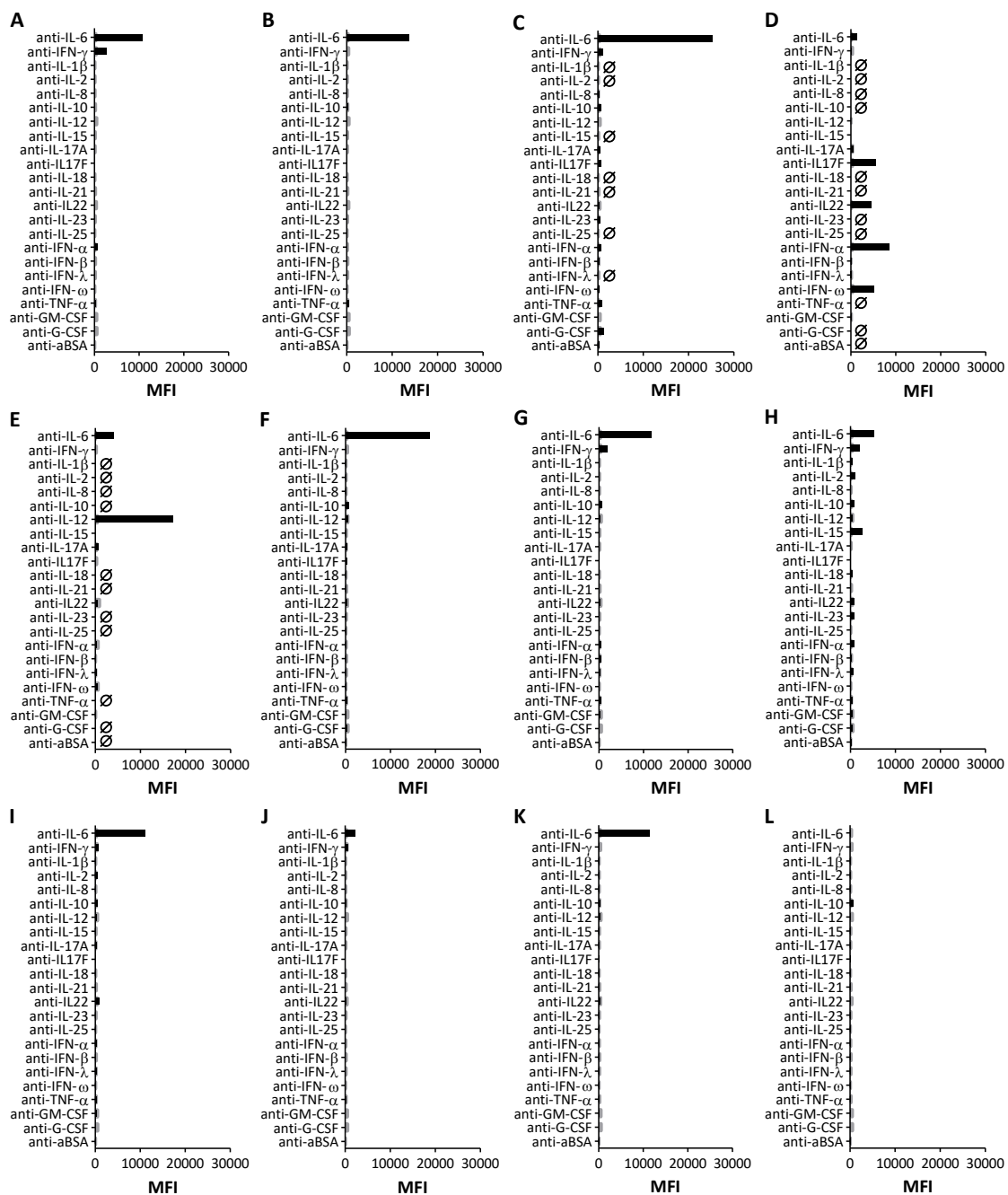
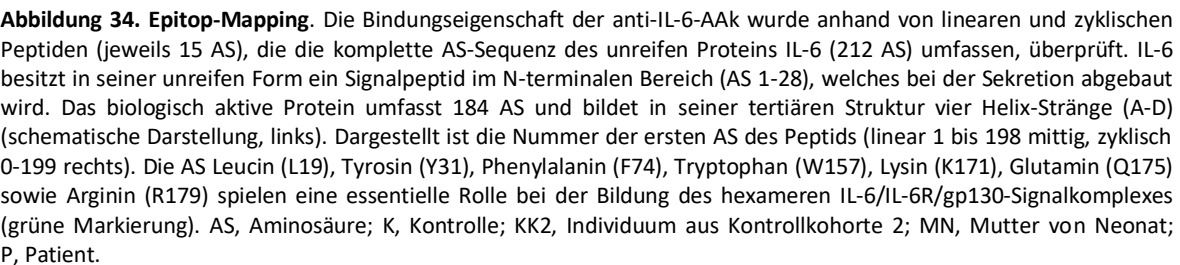


Abbildung 33. Analyse von anti-Zytokin-AAK in Patienten und Individuen mit anti-IL-6-AAK. Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe eines Multiplex-Verfahrens inklusive spezifisch gekoppelten anti-Zytokin-Beads. Die Darstellung der AAK-Titer erfolgt anhand der Fluoreszenzintensität (MFI). Die gesunden Kontrollindividuen sind grau hinterlegt, während die Patienten und Individuen mit anti-IL-6-AAK schwarz unterlegt sind. (A) Anti-Zytokin-AAK in P1. (B) Anti-Zytokin-AAK in P2. (C) Anti-Zytokin-AAK in P3. (D) Anti-Zytokin-AAK in P4. (E) Anti-Zytokin-AAK in P5. (F) Anti-Zytokin-AAK in KK2-1. (G) Anti-Zytokin-AAK in MN1. (H) Anti-Zytokin-AAK in N1. (I) Anti-Zytokin-AAK in MN2. (J) Anti-Zytokin-AAK in N2. (K) Anti-Zytokin-AAK in MN3. (L) Anti-Zytokin-AAK in N3. \emptyset , Nicht bestimmt; AAK, Autoantikörper; KK2-1, Individuum aus Kontrollkohorte 2; MFI, Mean fluorescence intensity; MN, Mutter von Neonat; N, Neonat; P, Patient.

7.2.8. Epitop-Mapping

Mittels Epitop-Mapping wurden die AAK-Bindungsstellen an das Protein IL-6 analysiert. Die Bindungsstärke zwischen AAK und IL-6-Peptid wurde mit Hilfe einer farblichen Skala visualisiert, in der hellgelb eine schwache und rot eine starke Bindung darstellt. Die AAK von P1 zeigten eine starke Bindung an die linearen Peptide 172-186 und 178-192 sowie an das zyklische Peptid 172-186. Die AAK von P2 banden an die linearen Abschnitte 84-98 und 88-102 sowie an die zyklischen Peptide 84-98 und 88-102. Für P3 wurde eine verstärkte Bindung an die linearen Peptide 92-106 und 104-118 sowie an das zyklische Peptid 92-106 detektiert. Bei P4 zeichnete sich eine Interaktion zwischen den AAK und den linearen Peptiden 116-130, 120-134 und 145-159 sowie den zyklischen Peptiden 16-30, 60-74 und 120-134 ab. P5 besaß eine Bindungsstelle im Bereich des linearen Peptids 172-186. Für die Mütter MN1 und MN3 wurde eine verstärkte Interaktion zwischen den AAK und den linearen Peptiden 172-186 bzw. 145-159 detektiert. Für die anti-IL-6-AAK von KK2-1 und MN2 konnten weder auf linearer noch auf zyklischer Ebene Bindungsstellen an die einzelnen IL-6-Peptide nachgewiesen werden (Abbildung 34).

Anschließend wurden die detektierten Bindungsstellen in Bezug auf das reife IL-6 Protein (184 AS) betrachtet. Die anti-IL-6-AAK von P2, P3 und P4 zeigten eine hohe Bindungsaffinität im Bereich der AS Phenylalanin 74 (F74). Diese AS ist essentiell bei der Bildung des hexameren IL-6/IL-6R/gp130-Komplexes und spielt eine entscheidende Rolle bei der initialen IL-6/IL-6R-Dimerisierung über die Bindungsstelle I. P4 zeigte zusätzlich eine Interaktion mit einem zyklischen Peptid im Bereich der AS Tyrosin 31 (Y31). Diese AS ist beteiligt an der anschließenden Trimerbildung von IL-6/IL-6R und gp130 über die Bindungsstelle IIa. Die AAK von P1, P5 und MN1 präsentierten in der Nähe der AS Tryptophan 157 (W157) eine erhöhte Bindungseigenschaft. W157 ist entscheidend für die Bildung des hexameren IL-6/IL-6R/gp130-Signalkomplexes über die Bindungsstelle IIIa (Abbildung 35) [101, 102].



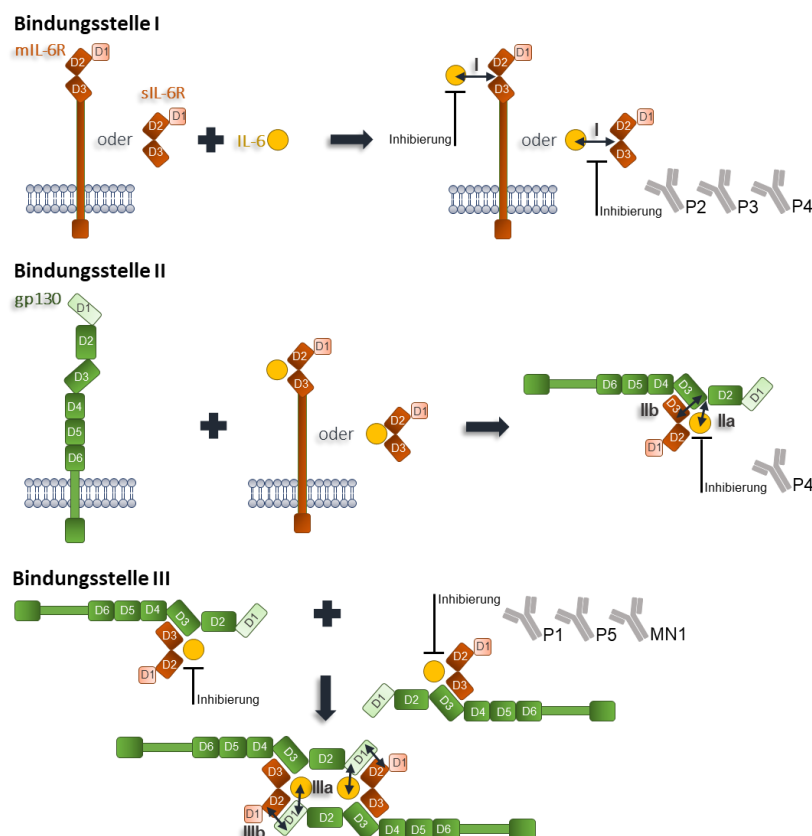


Abbildung 35. Bindung der anti-IL-6-Ak innerhalb des IL-6-Signalkomplexes. Der hexamere IL-6/IL-6R/gp130-Signalkomplex basiert auf drei Bindungsstellen. Die erste Bindung erfolgt zwischen einem IL-6 und einem membranständigen bzw. löslichen IL-6R über die Bindungsstelle I. Über die zweite Bindung (IIa und IIb) mit einem membranständigen gp130 bilden sich trimere Proteinkomplexe (IL-6/IL-6R/gp130). Abschließend formen zwei IL-6/IL-6R/gp130-Heterotrimere über die Bindungsstellen IIIa und IIIb den hexameren IL-6-Signalkomplex. Die AAK von P2, P3 und P4 präsentierten im Epitop-Mapping eine erhöhte Bindungseigenschaft zu der AS F74, die sich im Bereich der ersten Bindungsstelle befindet. Die AAK von P4 zeigten zudem eine erhöhte Interaktion mit einem zyklischen Peptid im Bereich der AS Y31, welche im Bereich der Bindungsstelle IIa lokalisiert ist. Die AAK von P1, P5 und MN1 präsentierten eine erhöhte Bindungseigenschaft zu der AS W157, die sich im Bereich der Bindungsstelle IIIa befindet. AS, Aminosäure; D, Domäne.

7.2.9. Zeitlicher Verlauf des Ak-Titers

Innerhalb dieser Arbeit wurde die Höhe der anti-IL-6-Ak-Titer im zeitlichen Verlauf überprüft. Dargestellt wurde die prozentuale Signalstärke zu einer positiven internen Kontrolle, die als 100 % definiert wurde (Abbildung 36). Der AAK-Titer von P1 sank im Abstand von 3 ½ Jahren von 304 % auf 23 %. P2 besaß hingegen einen konstanten AAK-Titer über 13 Jahre (240 % → 226 %). Der anti-IL-6-IgG-Ak-Titer von P3 blieb im Abstand von einem Monat konstant (433 % → 447 %). Der gesunde Jugendliche aus der Kontrollkohorte KK2 (KK2-1) zeigte über einen Zeitraum von 3 ½ Jahren einen AAK-Anstieg von > 50 % (83 % → 133 %). Während der anti-IL-6-IgG-Ak-Titer von MN1 über drei Jahre konstant blieb (223 % → 236 %), sank der AAK-Spiegel von N1 (155 % → 55 %). Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei dem Mutter-Kind-Paar MN2 (161 % → 161 %) und N2 (82 % → 9 %) in einem zeitlichen Abstand von sechs Monaten ab.

Leider standen von den Patienten P4 und P5 sowie von der Mutter MN3 und dem dazugehörigen Kind N3 keine nachfolgenden Vergleichsproben zur Verfügung. Der Abfall der Titer in den Neonaten zeigt, dass die AAK gegen IL-6 im letzten Trimenon von den Müttern auf die Kinder übertragen wurden.

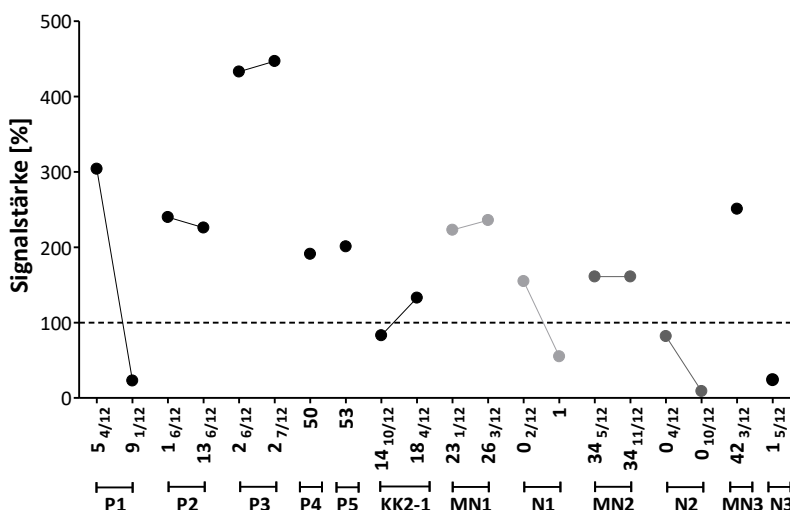


Abbildung 36. Zeitlicher Verlauf der anti-IL-6-IgG-AAK-Titer. Die Analyse erfolgte mit einem anti-IL-6-IgG-AAK-ELISA. Die Darstellung der Signale erfolgt in Prozent einer internen positiven Kontrolle, hier dargestellt als 100 % Markierung (gestrichelte schwarze Linie). Auf der X-Achse sind die Altersangaben der einzelnen Patienten bzw. Individuen aufgeführt (initialer Titer → Kontrolltiter). Die Mütter (MN) und die dazugehörigen Neonaten (N) wurden in unterschiedlichen Graustufen dargestellt. KK2-1, Individuum aus Kontrollkohorte 2; P, Patient.

7.2.10. Zusammenfassung – Prävalenz und Eigenschaften neutralisierender anti-IL-6-AAK

In PK1 (Patienten mit bakteriellen Infektionen) wurden vier Patienten (inklusive P1) mit spezifischen (4/349, 1,1 %), jedoch nur zwei Patienten mit neutralisierenden AAK gegen IL-6 (2/349, 0,6 %), detektiert. In PK2 (Patienten mit Autoimmunerkrankungen) wurden vier Patienten mit hoch-titrigen spezifischen AAK gegen IL-6 (4/546, 0,7 %), von denen zwei einen neutralisierenden Effekt besaßen (2/546, 0,4 %), nachgewiesen. In PK3 (Patienten mit mykobakteriellen Infektionen) besaßen drei Patienten spezifische AAK gegen IL-6 (3/366, 0,8 %), die jedoch keine neutralisierende Wirkung (0/366, 0,0 %) aufwiesen. Innerhalb der Kontrollkohorten wurden fünf Individuen aus KK1 (Individuen mit Impftiterstatus-Überprüfung, 5/405, 1,2 %), 12 Individuen aus KK2 (jugendliche Individuen mit Übergewicht, 12/455, 2,6 %) und zwei Individuen aus KK3 (Patienten mit Hypothyreose, 2/128, 1,6 %) mit spezifischen AAK gegen IL-6 bestimmt. Nur ein Patient aus KK2 besaß neutralisierende anti-IL-6-AAK (KK1-3 → 1/988, 0,1 % bzw. KK2 → 1/455, 0,22 %). Zusätzlich zu den analysierten Kohorten wurden drei bisher gesunde Frauen mit hoch-titrigen, neutralisierenden anti-IL-6-AAK identifiziert. Die detektierten anti-IL-6-AAK (n = 9 → P1-5, KK2-1 und MN1-3) inhibierten sowohl den klassisch- als auch den trans-vermittelten IL-6-Signalweg. Sechs Individuen (P1-5 und MN1) konnte mittels Epitop-Mapping eine spezifische AAK-Bindungsstelle an IL-6, die verantwortlich für die Bildung des diheterotrimeren Signalkomplexes ist, zugewiesen werden. Der AAK-Titer von P1 sank im Verlauf, während die Titer von P2, MN1 und MN2 konstant blieben. Von P4, P5 und MN3 konnte keine Verlaufskontrolle durchgeführt werden.

8. Diskussion

8.1. Einschätzung der klinischen Prognose anhand des immunologischen Phänotyps bei Patienten mit NEMO-Defekt

8.1.1. Verlust der funktionellen ZF-Domäne verursacht typischen immunologischen Phänotyp und schweren klinischen Verlauf

Die Mutation des Patienten P1A_m befindet sich direkt in der Spleißregion zwischen dem neunten und zehnten Exon von *IKBKG* (IVS9+1 G>A) und führt nach erfolgter Transkription zu einer vollständigen Deletion des neunten Exons. Die NEMO-kodierende Sequenz verkürzt sich dadurch um 62 bp und hat auf Ebene der AS-Sequenz eine Verschiebung des Leserasters mit vorzeitigem Stopcodon (p. R352Sfs373X) sowie den Verlust der C-terminalen ZF-Domäne (AS 397-417) zur Folge. Die hochkonservierte ZF-Domäne des NEMO-Proteins ist an der B- und T-Zellaktivierung sowie an der T-Zellproliferation beteiligt und interagiert über eine Ubiquitin-Bindungsdomäne mit anderen Komponenten des NF- κ B-Signalwegs [181]. Sowohl Zonana et al. als auch Pachlopnik-Schmid et al. beschrieben, dass der Verlust dieser Domäne zu einer verminderten T-Zellproliferation führt [118, 182]. Diese Beobachtungen decken sich mit dem Phänotyp des Patienten P1A_m (eingeschränkte T-Zellproliferation nach Stimulation mit CD3, CD3/CD28, PHA und OKT3, stark verminderte Produktion von IL-6 und IL-10, eingeschränkter I κ B α -Abbau nach Stimulation).

Bisher wurde der Verlust des neunten Exons nur in zwei anderen Patienten mit *IKBKG*-Mutation beschrieben. Bei dem ersten Patienten handelte es sich um einen 15-jährigen Jungen mit einer *de novo* *IKBKG*-Mutation im Bereich der intronisch-liegenden Sequenz zwischen dem achten und neunten Exon (IVS9-1 G>A, Akzeptor-Spleißstelle). Der Patient wies keine Anzeichen einer EDA auf. Er litt unter wiederkehrenden Pneumonien, einer durch *H. influenzae* verursachten Sepsis sowie an *M. bovis* hervorgerufenen Hautläsionen. Sein IgG₃-Spiegel war erniedrigt (< 0,1 g/l) und er besaß eine eingeschränkte Produktion von spezifischen Ak. Als therapeutischer Ansatz wurde eine IgG-Substitution gewählt [183, 184]. Der Patient verstarb im Laufe der nachfolgenden Jahre an einer unbekannten Ursache (persönliche Kommunikation mit J. Orange). Im Jahr 2016 wurde ein weiterer Junge (Säugling) mit einer intronisch-liegenden *IKBKG*-Mutation (IVS9+5 G>C, Donor-Spleißstelle) mit Exon-9-Deletion beschrieben. Seine Mutter ist Konduktorin der Mutation und weist eine IP auf. Der Patient hatte einen EDA-ähnlichen Phänotyp in Form von sehr dünnem Haar, fehlenden Augenbrauen sowie Wimpern. 10 Tage nach der Geburt zeigte der Patient Anzeichen einer Körperversteifung mit abweichender Augenlinie. Er zeigte Infiltrate in der Lunge, Auffälligkeiten in der weißen Hirnsubstanz sowie eine Porenzephalie. Ein positiver Nachweis von *S. aureus* in Blut, Urin und Cerebrospinalflüssigkeit führte zur Einleitung einer antibiotischen Therapie.

Aufgrund eines deutlich verminderten Spiegels an IgG (2,01 g/l) sowie IgM (< 0,05 g/l) erhielt der Patient zusätzlich eine IgG-Substitution. Der Zustand verschlechterte sich trotz Therapie rapide und führte schlussendlich zum Tod des Patienten [185]. Der dramatische Verlauf der beiden beschriebenen Fälle sowie die Beobachtung, dass die ZF-Domäne an der T-Zellaktivierung und T-Zellproliferation beteiligt ist, lassen den hier vorliegenden NEMO-Defekt zu den schwerwiegenden Varianten zählen, die mit einer antibiotischen Prophylaxe und einer IgG-Substitution zu keinem erfolgversprechenden Behandlungsergebnis führen und einer HSZT bedürfen.

Der Phänotyp von P1A_m wurde mit weiteren Patienten (P1B_m, P1C_m und P1D_m), die einen NEMO-Defekt jedoch keinen Verlust der funktionellen ZF-Domäne innerhalb des NEMO-Proteins besitzen, verglichen [178, 179]. Die Patienten P1B_m und P1C_m weisen jeweils einen im Leseraster-verbleibenden AS-Austausch innerhalb der CC1-Domäne (P1B_m, Leucin → Prolin, L80P; P1C_m, Asparaginsäure → Asparagin, D113N) auf. Diese Domäne ist essentiell für die Verbindung der drei Signalkomplexeinheiten IKK α , IKK β und IKK γ (NEMO) innerhalb des NF- κ B-Signalwegs. Sowohl P1B_m als auch P1C_m litten an wiederkehrenden Atemwegsinfektionen, Pneumonien und Herpesläsionen (*Herpes labialis*). Während P1B_m einen EDA-ID-Phänotyp mit ausgeprägter Zahnanomalie besaß, wies P1C_m keinen EDA-ähnlichen Phänotyp auf. Beide Patienten präsentierten eine eingeschränkte Produktion an Polysaccharid-spezifischen Ak und zeigten eine verminderte IL-6-Produktion nach Stimulation mit PAM₂CSK₄ (TLR2-Agonist) und IL-1 β . P1C_m zeigte im Vergleich zu P1B_m eine normale IL-10-Produktion nach TNF- α -Stimulation. Unter einer dauerhaften subkutanen IgG-Substitution traten keine schweren bakteriellen Infektionen mehr auf, so dass aktuell nur noch bei Bedarf mit Antibiotika behandelt werden muss. Diese Verläufe legen nahe, dass eine Beeinträchtigung der Proteinstruktur durch einen AS-Austausch im Bereich der CC1-Domäne zwar zu einer eingeschränkten Immunantwort führt, diese jedoch durch eine IgG-Substitution therapierbar ist. P1D_m besitzt wiederum einen AS-Austausch innerhalb der LZ-Domäne (Arginin → Glutamin, R319Q). Diese Domäne ist zusammen mit der CC2-Domäne an der Ubiquitylierung von NEMO und der damit verbundenen Signaltransduktion innerhalb des NF- κ B-Signalwegs beteiligt. P1D_m erkrankte an einem Lymphknoten-Abszess durch *H. influenzae* und litt mehrfach an Pneumonien sowie Staphylodermien. Hinzu kam eine vermutete mykobakterielle Infektion. Er präsentierte zu keinem Zeitpunkt einen EDA-ähnlichen Phänotyp. Er zeigte jedoch eine Reduktion der klassengewechselten B-Gedächtniszellen sowie naiven T-Zellen. Die Produktion von Polysaccharid-spezifischen Ak war eingeschränkt. Die Produktion von IL-6 nach Stimulation mit TLR-Agonisten (PAM₂CSK₄ → TLR2, LPS → TLR4) und IL-1 β war unauffällig, während die Ausschüttung von IL-10 nach Stimulation mit TNF- α vermindert war. P1D_m erhält zurzeit weder eine antibiotische Prophylaxe noch eine IgG-Substitution und befindet sich in einem guten gesundheitlichen Zustand ohne schwere Infektionen.

Die detaillierte Charakterisierung der vier Patienten zeigt, dass die Prognose für NEMO-Defekt-Patienten erheblich von der Funktion der T-Zellen und der Proteinstruktur, vor allem unter Berücksichtigung der ZF-Domäne, abhängt. Diese Beobachtung wird durch die systematische Reanalyse aller bisher publizierten Patienten mit NEMO-Defekt bestätigt. Patienten mit einer Beeinträchtigung der ZF-Domäne (kompletter Verlust durch Stopcodon, Verlust oder Expansion durch Leserasterverschiebung, AS-Austausch) weisen im Vergleich zu anderen Patienten einen schwereren klinischen Verlauf auf (Tabelle 40, Appendix) [117].

8.1.2. Untersuchung der angeborenen und adaptiven Immunität erlaubt eine Einschätzung der klinischen Prognose bei Patienten mit NEMO-Defekt

Bisher wurde der X-chromosomale NEMO-Defekt vor allem als Defekt der angeborenen Immunität mit Antikörpermangel definiert, dessen immunologischer Kernphänotyp Folgendes beinhaltet: Reduktion von IgG (vor allem IgG₂), Hyper-IgM-Syndrom, fehlende bzw. verminderte Produktion von spezifischen Ak, verminderte klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen, verminderte Produktion von IL-10 nach Stimulation mit TNF- α [46]. Ähnlich wie bei isolierten Defekten der angeborenen Immunität (MyD88- oder IRAK4-Defekt [186]) scheint bei Patienten mit NEMO-Defekt die Schwere der Erkrankung mit zunehmendem Alter abzunehmen. Jedoch kann der klinische Verlauf mit schweren lebensbedrohlichen Infektionen einhergehen, sodass die frühzeitige Einschätzung der Prognose essentiell für die optimale Wahl der Therapie ist.

P1A_m wies aufgrund der intronisch-liegenden Mutation IVS9+1 G>A eine verminderte NEMO-Expression in verschiedenen Zellkompartimenten (T-Zellen, Monozyten und SV40-immortalisierte Fibroblasten) auf. Im Gegensatz zu fast allen bisher beschriebenen Patienten mit NEMO-Defekt verursachte diese Mutation nicht nur die häufig beobachteten Einschränkungen (Hypogammaglobulinämie, verminderte klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen, verminderte IL-10 Produktion nach TNF- α -Stimulation), sondern beinhaltete auch einen von Geburt an sichtbaren T-Zelldefekt (stark verminderte Gedächtnis-T-Zellen, verminderte T-Zellproliferation nach Stimulation mit CD3, CD3/CD28, PHA und OKT3). Des Weiteren präsentierte P1A_m eine bei NEMO-Defekten unüblich stark verminderte angeborene Immunantwort hinsichtlich der IL-6-Produktion nach Stimulation mit TLR-spezifischen Agonisten (PAM₂CSK₄ → TLR2-Agonist, LPS → TLR4-Agonist) und IL-1 β . Dieser Phänotyp (eingeschränkte Produktion von IL-6 nach Stimulation mit TLR-Agonisten und IL-1 β , eingeschränkter I κ B α -Abbau, verminderte T-Zellproliferation nach Stimulation mit CD3 und PHA) ist vergleichbar mit Patienten, die eine *NFKBIA*-Mutation aufweisen [187].

NFKBIA (*NF- κ B inhibitor α*) kodiert das inhibitorisch-wirkende Protein $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, welches im Ruhezustand der Zelle den Transkriptionsfaktor NF- κ B im Zytoplasma blockiert. Diese inhibitorische Einheit wird bei Aktivierung des trimeren IKK-Komplexes ($\text{IKK}\alpha$, $\text{IKK}\beta$ und $\text{IKK}\gamma$, alias NEMO) phosphoryliert und proteosomal abgebaut, wodurch der Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Nukleus wandern und die Transkription auslösen kann. In den vergangenen Jahren wurden mehr als zehn Patienten mit *NFKBIA*-Mutationen beschrieben, von denen ein Großteil (ähnlich wie der hier beschriebene NEMO-Defekt Patient P1A_m) einen hohen Anteil an naiven CD45RA^+ T-Zellen, verminderte CD45RO^+ Gedächtnis-T-Zellen und eine eingeschränkte T-Zellproliferation aufwiesen [187-190]. Angesichts des deutlichen T-Zelldefekts erfolgte bei den meisten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Defekt Patienten eine HSZT [187, 191]. Vor diesem Hintergrund wurde bereits unmittelbar nach der Geburt eine HSZT bei dem Patienten P1A_m empfohlen und wegen des schlechten klinischen Verlaufs schließlich auch durchgeführt [192]. Anhand des immunologischen Phänotyps (reduziertes IgM, verminderte Anzahl an Gedächtnis-T-Zellen, eingeschränkte T-Zellproliferation, stark verminderte Produktion von IL-6 und IL-10 nach Stimulation) kann somit frühzeitig ein schwerer klinischer Verlauf prognostiziert und die Indikation zur HSZT gestellt werden.

8.2. Anti-IL-6-AAk - Phänokopie primärer ID?

AAk gegen GM-CSF, IFN- γ sowie IL-17A/F werden aufgrund ihres neutralisierenden Wirkmechanismus auf die jeweilige Signalkaskade als PID-Phänokopien definiert. Sie besitzen in ihrer klinischen Präsentation, mit Ausnahme des anti-GM-CSF-AAks, eine fast 100%ige Deckungsgleichheit zu den korrespondierenden Rezeptor-, Produktions- bzw. Signalwegsdefekten und konnten bereits in mehreren Patienten nachgewiesen werden [136, 149, 150, 164, 193, 194]. Die drei bisher publizierten anti-IL-6-AAk-positiven Patienten legen nahe [114, 115], dass natürlich vorkommende AAk gegen IL-6 durch ihren neutralisierenden Effekt ebenfalls einem PID mit eingeschränkter IL-6-Produktion bzw. Wirkung gleichen. Alle Patienten litten an schweren bakteriellen Infektionen (Hautinfektionen durch *S. aureus* [114], Empyem durch *E. coli* / *S. intermedius* sowie subkutane Hautabszesse durch *S. aureus* [115]), die dem klinischen Phänotyp von Patienten mit STAT3- (Pneumonien und bakterielle Hautinfektionen [195]), MyD88-, IRAK4- oder $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Defekt (invasive bakterielle Infektionen, wie Sepsis und Meningitis [112]) sehr stark ähneln. Eine noch stärkere Übereinstimmung des infektiologischen und immunologischen Phänotyps konnte mit den erst kürzlich beschriebenen IL-6R-Defekt-Patienten beobachtet werden. Die IL-6R-defizienten Patienten litten an schweren bakteriellen Infektionen (Hautinfektionen durch *Staphylococcus spp.* sowie Pneumonien) und präsentierten trotz des Schweregrads ihrer Erkrankung keine bzw. nur eine sehr geringe Erhöhung des Akut-Phase-Proteins CrP. Des Weiteren zeigten einige von ihnen einen erhöhten IgE-Spiegel sowie einen Anstieg der IL-6-Konzentration [167, 168].

Dennoch konnten spezifische anti-IL-6-AAk auch in gesunden Individuen, die bisher keine schwere Infektion entwickelten [196-198], als auch in humanen IgG-Präparaten nachgewiesen werden (Tabelle 38 und Tabelle 39) [196-200]. Eine Analyse der neutralisierenden Wirkung erfolgte in den meisten Fällen jedoch nicht, so dass ein direkter Vergleich dieser anti-IL-6-AAk bzgl. des Wirkmechanismus bisher nicht durchgeführt werden konnte. In welchem Maß anti-IL-6-AAk zu Infektionen prädisponieren, wird in der hier vorliegenden Arbeit erstmalig systematisch untersucht.

Tabelle 38. Nachweis von anti-IL-6-AAk in gesunden Probanden

Jahr	Anzahl gesunder Probanden [n]	Anti-IL-6-AAk Frequenz [%]	Nachweis von neutralisierendem Effekt <i>in vitro</i>	Publikation
1991	68	10,3 (n = 7)	-	[196]
1992	104	1,9 (n = 2)	-	[201]
1993	467	15 (n = 71)	+	[197]
1995	40	13 (n = 5)	-	[202]
2004	4230	9 (niedriger Titer) 1 (hoher Titer) 0,1 (vergleichbar zu IL-6 ^{-/-} Maus)	+	[198]
2007	15	6,7 (n = 1)	-	[141]
2010	796	10 (n = 80)	-	[203]
2010	30	3,3 (n = 1)	-	[204]
2017	8972	65 (n = 5835)	-	[200]

AAk, Autoantikörper; IL-6^{-/-} Maus, IL-6-defiziente Maus; n, Anzahl; +, Nachweis eines neutralisierenden Effekts in einem *in vitro* Experiment; -, Kein Nachweis eines neutralisierenden Effekts in einem *in vitro* Experiment

Tabelle 39. Nachweis von anti-IL-6-AAk in Serumpräparaten

Jahr	Anti-IL-6-AAk-positives IgG-Präparat	Publikation
1993	Nordimmun	[197]
1993	Nordimmun	[205]
1995	Gammagard, Sandoglobulin, Nordimmun, Endobulin, Gammonativ	[199]
1997	Gammagard, Sandoglobulin	[206]

AAk, Autoantikörper

8.2.1. Die Prävalenz von anti-IL-6-AAk in Patienten mit bakteriellen Infektionen ist im Vergleich zu Patienten / Individuen ohne bakterielle Infektionen nicht erhöht

Die Identifizierung von hoch-titrigen neutralisierend-wirkenden anti-IL-6-AAk in einem Jungen (Patient P1), der zuvor gesund war und an einer schweren nekrotisierenden Streptokokken-Pneumonie erkrankte, sowie die drei bisher beschriebenen Patienten mit AAK gegen IL-6 und schweren bakteriellen Infektionen [114, 115], führten zu der Frage, ob die Prävalenz von anti-IL-6-AAk in Patienten mit schweren bakteriellen Infektion erhöht ist. Zu diesem Zweck wurden sechs Kohorten systematisch auf anti-IL-6-AAk analysiert: PK1 (349 Patienten mit mindestens einer schweren bakteriellen Infektion), PK2 (564 Patienten mit Autoimmunerkrankung), PK3 (366 Patienten mit mykobakteriellen Infektionen), KK1 (405 Individuen, deren Impftiterstatus überprüft wurde), KK2 (455 jugendliche Individuen mit Übergewicht) und KK3 (128 Individuen mit Hypothyreose). In PK1 wurden vier Patienten (inklusive P1) mit spezifischen AAK gegen IL-6 bestimmt (4/349, 1,1 %). In PK2 wurden vier Patienten mit hoch-titrigen spezifischen anti-IL-6-AAk nachgewiesen (4/546, 0,7 %). In PK3 besaßen drei Patienten spezifische AAK gegen IL-6 (3/366, 0,8 %). Innerhalb der Kontrollkohorten wurden fünf Individuen aus KK1 (5/405, 1,2 %), 12 Individuen aus KK2 (12/455, 2,6 %) und zwei Individuen aus KK3 (2/128, 1,6 %) mit spezifischen anti-IL-6-AAk bestimmt. Parallel zu den durchgeführten Analysen wurden drei Mütter (MN1-3) mit spezifischen anti-IL-6-AAk identifiziert, die trotz hohem AAK-Titer weder während der Schwangerschaft noch in der darauffolgenden Zeit an bakteriellen Infektionen erkrankten. Anhand dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, warum nicht alle Individuen mit hoch-titrigen, spezifischen anti-IL-6-AAk an schweren bakteriellen Infektionen erkrankten. Die detektierten AAK zeigten eine hohe spezifische Bindung an IL-6, jedoch konnte anhand dieser Resultate kein neutralisierender Effekt auf den IL-6-induzierten Signalweg (klassisch oder trans) abgeleitet werden. Vor diesem Hintergrund wurde die STAT3-Phosphorylierung in Verbindung mit anti-IL-6-AAk-positiven Serum nach Stimulation mit IL-6 in verschiedenen Zellsystemen überprüft. In PK1 wurden zwei Patienten (P1, P3) mit neutralisierenden anti-IL-6-AAk identifiziert (2/349, ~ 0,6 %). In PK2 zeigten zwei Patienten (P4, P5) mit hoch-titrigen spezifischen anti-IL-6-AAk einen neutralisierenden Effekt auf die STAT3-Phosphorylierung (2/564, ~ 0,4 %). PK3 enthielt keine Patienten mit neutralisierenden AAK. Innerhalb der Kontrollkohorten präsentierte ein Individuum (KK2-1) aus der Kohorte KK2 anti-IL-6-AAk mit neutralisierender Wirkung (KK1-3, 1/988, ~ 0,1 %). Die Prävalenz von neutralisierenden anti-IL-6-AAk in Patienten mit bakteriellen Infektionen ist somit nicht höher als in Patienten / Individuen ohne bakterielle Infektion. Des Weiteren wurde die Annahme, dass es sich bei Patienten mit bakteriellen Infektionen um neutralisierende und bei Patienten / Individuen ohne bakterielle Infektion um nicht-neutralisierende anti-IL-6-AAk handelt, widerlegt.

Ein unterschiedlicher Wirkmechanismus auf den klassischen bzw. trans IL-6-Signalweg konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Die hier erhaltenen Resultate (1/988, 0,1 % anti-IL-6-AAk-positive Individuen ohne bakterielle Infektion) bestätigen wiederum publizierte Daten, die von einer 0,1-1%igen AAK-Prävalenz mit neutralisierendem Effekt in gesunden Individuen ausgehen [198]. Zusätzlich zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse, dass anti-IL-6-AAk zu bakteriellen Infektionen prädisponieren, wenn diese AAK einen neutralisierenden Effekt auf die IL-6-induzierte Signalkaskade haben. Eine spezifische Bindung an IL-6 allein stellt keinen Orientierungspunkt für eine möglich Prädisposition dar. AAK mit einer spezifischen Bindung an IL-6, jedoch ohne neutralisierende Wirkung auf den IL-6-Signalweg, prädisponieren vermutlich nicht zu bakteriellen Infektionen.

8.2.2. Anti-IL-6-AAk von Patienten mit bakteriellen Infektionen erkennen spezifische, jedoch unterschiedliche IL-6-Epitope

Für zwei der drei zuvor beschriebenen anti-IL-6-AAk-positiven Patienten wurde ein identisches IL-6-Epitop ermittelt [115]. Dabei handelt es sich um ein 15-AS-langes IL-6-Peptid inklusive der AS Tryptophan 157 (W157). Diese AS ist essentiell für die Bildung des hexameren Signalkomplexes (2 x IL-6/IL-6R/gp130) über die Bindungsstelle IIIa. Die IL-6-Bindung und die damit einhergehende Hemmung des Signalkomplexes sind identisch mit pharmakologisch entwickelten Ak, die aufgrund einer erhöhten Konzentration von IL-6 (siehe Patienten mit rheumatischer Arthritis oder systemischen Lupus erythematoses) eingesetzt werden und sich gegen das Zytokin IL-6 (Siltuximab, Olokizumab und Sirukumab) [207-209] bzw. gegen den Rezeptor IL-6R (Tocilizumab und Sarilumab) richten [210, 211]. Olokizumab bindet ebenfalls im Bereich der Bindungsstelle IIIa und verhindert dadurch die Bildung des finalen hexameren Komplexes zur intrazellulären Signaltransduktion [212]. Allen therapeutischen Ansätzen gemein sind die Nebenwirkungen in Form von bakteriellen, mykobakteriellen und viralen Infektionen (letztere beide im geringeren Ausmaß) [208-211, 213]. Anhand dieser Daten wurde vermutet, dass die AAK von Patienten mit bakteriellen Infektionen an ein und dasselbe IL-6-Epitop binden, während Patienten / Individuen ohne bakterielle Infektionen andere IL-6-Bindungsstellen auf dem IL-6-Signalkomplex aufweisen. Für die meisten neutralisierenden anti-IL-6-AAk in dieser Arbeit (mit Ausnahme von MN2, MN3 und KK2-1) konnte mittels Epitop-Mapping eine Bindung an Epitope, die für die Bildung des hexameren Signalkomplexes essentiell sind, bestimmt werden (Abbildung 35). Die Patienten mit bakteriellen Infektionen besaßen dabei jedoch keine einheitliche Bindungsstelle an die AS W157 (P1 → W157, P2 → Phenylalanin F74, P3 → F74). W157 wurde ebenfalls von anti-IL-6-AAk von Patienten / Individuen ohne bakterielle Infektionen erkannt (P5, MN1). Ein Unterschied bzgl. der AAK-Bindungseigenschaft zwischen Patienten mit und Individuen ohne bakterielle Infektionen wurde somit ausgeschlossen.

8.3. Ausblick

8.3.1. Einschätzung der klinischen Prognose von Patienten mit NEMO-Defekt durch Untersuchung der angeborenen und adaptiven Immunität

Die detaillierte immunologische Phänotypisierung eines Patienten mit NEMO-Defekt mit verkürzter Proteinvariante (Verlust der funktionellen C-terminalen ZF-Domäne), ausgeprägtem T-Zelldefekt (fast vollständige Persistenz naiver CD45RA⁺ T-Zellen, verminderte T-Zellproliferation) und schwerem klinischen Verlauf sowie der detaillierte Vergleich des immunologischen Phänotyps mit drei weiteren Patienten und allen bisher publizierten Fällen erleichtert die Einschätzung der klinischen Prognose für Patienten mit NEMO-Defekt. Da die Verteilung von naiven CD45RA⁺ und CD45RO⁺ Gedächtnis-T-Zellen sowie die T-Zellproliferation bei den bisher beschriebenen Patienten mit NEMO-Defekt nur sehr selten analysiert wurde, sollte in Zukunft bei allen Patienten mit *IKBKG*-Mutation eine Untersuchung der angeborenen und adaptiven Immunität erfolgen. Diese Ergebnisse könnten die hier dargestellte Vermutung, dass eine verminderte T-Zellproliferation und eine Persistenz der naiven T-Zellen mit einer ungünstigen klinischen Prognose einhergehen, weiter stützen und die Entscheidung für eine frühzeitige HSZT (vor Eintritt einer schweren, lebensbedrohlichen Infektion) erleichtern. Ebenso kann eine normale Verteilung von naiven CD45RA⁺ und CD45RO⁺ Gedächtnis-T-Zellen bei normaler T-Zellproliferation ein konservatives Vorgehen bei Patienten mit NEMO-Defekt rechtfertigen.

8.3.2. Neutralisierende anti-IL-6-AAk können, müssen jedoch nicht zu einer schweren bakteriellen Infektion führen

Die erstmalige systematische Prävalenzanalyse von anti-IL-6-AAk in verschiedenen Kohorten zeigt, dass natürlich vorkommende neutralisierende anti-IL-6-AAk die Entwicklung bakterieller Infektionen begünstigen können. Vorherige Untersuchungen dieser AAK beinhalteten vornehmlich die Fragestellung, ob IL-6 spezifisch gebunden wird. Die Inhibition der IL-6R-abhängigen Signalwege wurde dabei jedoch nicht betrachtet. Vor diesem Hintergrund sollten Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen, ohne nachweisbaren angeborenen ID, auf neutralisierende anti-IL-6-AAk untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit können nicht abschließend klären, warum nicht alle Individuen mit neutralisierenden anti-IL-6-AAk an bakteriellen Infektionen erkranken. Betrachtet man die Altersverteilung der bisher identifizierten Patienten / Individuen mit neutralisierenden anti-IL-6-AAk fällt jedoch auf, dass schwere bakterielle Infektionen im jungen (P1-3; vor dem 6. Lebensjahr) und höheren Lebensalter (P6 und P7 [115]; nach dem 55. Lebensjahr) eintraten. Individuen mit anti-IL-6-AAk im mittleren Lebensalter (KK2-1 und MN1-3; zwischen dem 14. und 55. Lebensjahr) präsentierten keine schweren Infektionen (Abbildung 37).

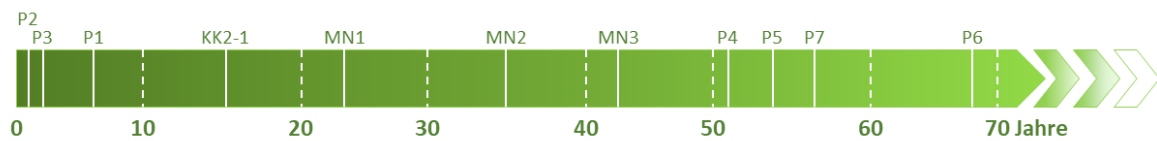


Abbildung 37. Altersverteilung von Patienten und Individuen mit neutralisierenden anti-IL-6-AAk. Die Altersangabe erfolgt in Jahren. Die neutralisierenden anti-IL-6-AAk der Patienten (P1-5) und Individuen (MN1-3, KK2-1) wurden in der vorliegenden Arbeit detektiert und charakterisiert. Der Phänotyp des Patienten P2 wurde erstmals im Jahr 2008 [114] beschrieben. Die Publikation der Patienten P6 und P7 erfolgte im Jahr 2013 [115].

Diese besondere Anfälligkeit für bakterielle Infektionen im Kleinkindalter ist auch bei Patienten mit MyD88- und IRAK4-Defekt zu beobachten, deren IL-6-Produktion und Akut-Phase-Reaktion stark vermindert sind. Nach der Pubertät treten bei diesen Patienten keine bakteriellen Infektionen (insbesondere *S. aureus*, *S. pneumoniae* oder *P. aeruginosa*) mehr auf [112, 186]. Sowohl der schwere klinische Phänotyp bei den jungen anti-IL-6-AAk-positiven Patienten als auch bei den jungen Patienten mit MyD88- und IRAK4-Defekt könnte damit erklärt werden, dass das Zytokin IL-6 für die Abwehr von bakteriellen Infektionen bis zur Pubertät wichtiger ist als im mittleren Lebensalter. Das Auftreten schwerer bakterieller Infektionen bei zwei älteren anti-IL-6-AAk-positiven Patienten (P6 und P7) könnte einen Hinweis auf eine erneut zunehmende Bedeutung von IL-6 jenseits des 55. Lebensjahrs sein. Eine weitere Erklärung für diese Altersverteilung kann die kommensale Besiedelung des menschlichen oberen Respirationstraktes liefern. Ein Großteil aller Säuglinge und Kleinkinder weist Pneumokokken (*S. pneumoniae*) im Nasopharynx sowie im Oropharynx auf [214-216]. Je nach Herkunftsland variiert die prozentuale Prävalenz dabei stark (gesunde Kinder < 5 Jahre in einkommensschwachen Ländern → 20-93,4 % [217], Kinder in einkommensstärkeren Ländern → 20-40 % [218]). Staphylokokken (*S. aureus*) sind in 20-30 % aller gesunden Kinder zu finden [215, 217, 219]. Dies lässt vermuten, dass in diesem Alter der IL-6-vermittelten Immunantwort eine höhere Bedeutung zukommen könnte als im späteren Alter (Pneumokokken → 5-10 % gesunde Erwachsene [218], Staphylokokken → 15-25 % gesunde Erwachsene [217, 220, 221]). Im Vergleich zu den beschriebenen IL-6R-Defekten, erkrankten nicht alle Individuen mit neutralisierenden anti-IL-6-AAk an schweren bakteriellen Infektionen, so dass eine 100%ige PID-Phänotypie ausgeschlossen werden kann. Die erhaltenen Ergebnisse legen jedoch ein erhöhtes Risiko für Kinder < 10 Jahren und Erwachsene > 50 Jahren nahe, so dass bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen in diesem Alter auch neutralisierende anti-IL-6-AAk als Ursache in Betracht gezogen werden sollten. Eine anti-CD20-Therapie, wie bei Patienten mit anderen anti-Zytokin-AAk, scheint bei Patienten mit anti-IL-6-AAk nicht notwendig, da die hier vorliegenden bakteriellen Infektionen besser antibiotisch beherrschbar sind als die Infektionen durch anti-GM-CSF- (Nokardien, Kryptokokken, *Aspergillus fumigatus*) oder anti-IFN- γ -AAk (Mykobakterien).

9. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1. DIE ADAPTIVE IMMUNANTWORT.	13
ABBILDUNG 2. SIGNALWEGE DES ANGEBORENEEN IMMUNSYSTEMS.	15
ABBILDUNG 3. KLASSISCHER UND TRANS IL-6-SIGNALWEG.	18
ABBILDUNG 4. SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON <i>IKBKG</i> UND NEMO.	20
ABBILDUNG 5. SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON <i>IKBKG</i> MIT LOKUS DER INTRONISCH-LIEGENDEN MUTATION IVS9+1 G>A.	44
ABBILDUNG 6. STAMMBAUM DES PATIENTEN P1A_M.	45
ABBILDUNG 7. IL-6- UND IL-10-PRODUKTION IM NABELSCHNURBLUT VON P1A_M NACH STIMULATION.	48
ABBILDUNG 8. INTRAZELLULÄRE NEMO-FÄRBUNG P1A_M.	49
ABBILDUNG 9. NEMO-EXPRESSION IN SV40-FIBROBLASTEN DES PATIENTEN P1A_M.	49
ABBILDUNG 10. I κ B α -ABBAU VON P1A_M NACH STIMULATION.	50
ABBILDUNG 11. IL-6-PRODUKTION VON SV40-FIBROBLASTEN P1A_M NACH STIMULATION.	50
ABBILDUNG 12. SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MUTATION IVS9+1 G>A AUF GENOMISCHER EBENE.	51
ABBILDUNG 13. DARSTELLUNG DER NEMO-KODIERENDEN SEQUENZ VON P1A_M.	52
ABBILDUNG 14. SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES NEMO-PROTEINS VON P1A_M.	53
ABBILDUNG 15. IL-6- UND IL-10-PRODUKTION VON P1B_M NACH STIMULATION.	58
ABBILDUNG 16. STAMMBAUM DES PATIENTEN P1C_M.	59
ABBILDUNG 17. IL-6- UND IL-10-PRODUKTION VON P1C_M NACH STIMULATION.	61
ABBILDUNG 18. IL-6- UND IL-10-PRODUKTION VON P1D_M NACH STIMULATION.	64
ABBILDUNG 19. SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES NEMO-PROTEINS VON P1B_M, P1C_M UND P1D_M.	65
ABBILDUNG 20. INTRAZELLULÄRE FÄRBUNG VON NEMO IN T-ZELLEN UND MONOZYTEN VON P1B_M, P1C_M UND P1D_M.	65
ABBILDUNG 21. RÖNTGEN-THORAX- UND CT-AUFNAHME DES PATIENTEN P1.	67
ABBILDUNG 22. PRODUKTION VON IL-6 IN PERIPHEREM BLUT VON P1 NACH STIMULATION.	68
ABBILDUNG 23. QUANTITATIVER NACHWEIS VON IL-6 IM ÜBERSTAND (CROSS-OVER-EXPERIMENT).	68
ABBILDUNG 24. SPEZIFISCHER ANTI-IL-6-IGG-SANDWICH-ELISA VON P1.	69
ABBILDUNG 25. ANTI-IL-6-AAK-SCREENING UND BESTIMMUNG DER IL-6-SPEZIFITÄT.	70
ABBILDUNG 26. STAT3-PHOSPHORYLIERUNG IN CD4 ⁺ T-ZELLEN NACH STIMULATION.	72
ABBILDUNG 27. STAT3-PHOSPHORYLIERUNG IN MURINEN PRO-B-ZELLEN NACH STIMULATION.	74
ABBILDUNG 28. IL-6-KONZENTRATION VON N1-3 IM ZEITLICHEN VERLAUF.	74
ABBILDUNG 29. ANTI-IL-6-AAK-UND SPEZIFITÄTSSCREENING IN MN1-3 UND N1-3.	75
ABBILDUNG 30. STAT3-PHOSPHORYLIERUNG VON MN1-3 IN CD4 ⁺ T-ZELLEN NACH STIMULATION.	75
ABBILDUNG 31. STAT3-PHOSPHORYLIERUNG VON MN1-3 IN MURINEN PRO-B-ZELLEN ZUR ANALYSE DES KLASSISCHEN UND TRANS IL-6-SIGNALWEGS.	76
ABBILDUNG 32. ANTI-IL-6-IGG-SUBKLASSEN-ELISA.	77
ABBILDUNG 33. ANALYSE VON ANTI-ZYTKIN-AAK IN PATIENTEN UND INDIVIDUEN MIT ANTI-IL-6-AAK.	79
ABBILDUNG 34. EPITOP-MAPPING.	81
ABBILDUNG 35. BINDUNG DER ANTI-IL-6-AAK INNERHALB DES IL-6-SIGNALKOMPLEXES.	82
ABBILDUNG 36. ZEITLICHER VERLAUF DER ANTI-IL-6-IGG-AAK-TITER.	83
ABBILDUNG 37. ALTERSVERTEILUNG VON PATIENTEN UND INDIVIDUEN MIT NEUTRALISIERENDEN ANTI-IL-6-AAK.	92

10. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1. ÜBERSICHT ZELLINIEN	26
TABELLE 2. GoTAQ-PCR (FIRMA TIB MOLBIOL, BERLIN, DEU)	27
TABELLE 3. cDNA-SYNTHESE (FIRMA INVITROGEN, CARLSBAD, USA)	28
TABELLE 4. RT-PCR (FIRMA TIB MOLBIOL, BERLIN, DEU)	28
TABELLE 5. LONG-RANGE PCR (<i>IKBKG</i> -SPEZIFISCHES AMPLIFIKAT AUF NG_009896.1)	28
TABELLE 6. ZUSAMMENSETZUNG PUFFER	31
TABELLE 7. ZUSAMMENSETZUNG EINES POLYACRYLAMIDGELS	36
TABELLE 8. WESTERNBLOT-ANTIKÖRPER	37
TABELLE 9. GoTAQ-PCR-PROGRAMM	38
TABELLE 10. RT-PCR PROGRAMM	39
TABELLE 11. LYMPHOZYTENPOPULATION VON P1A_M IM NABELSCHNURBLUT (LMU)	45
TABELLE 12. T-ZELLPOPULATIONEN VON P1A_M (LMU)	46
TABELLE 13. TZR-POSITIVE DOPPELT NEGATIVE T-ZELLEN VON P1A_M (LMU)	46
TABELLE 14. T-ZELLPROLIFERATION VON P1A_M (CFSE-FÄRBUNG, LMU)	46
TABELLE 15. T-ZELLPROLIFERATION VON P1A_M NACH STIMULATION (LMU)	47
TABELLE 16. B-ZELLPOPULATIONEN P1A_M (LMU)	47
TABELLE 17. IMMUNGLOBULINE VON P1A_M (LMU)	47
TABELLE 18. LYMPHOZYTENPOPULATIONEN VON P1B_M	56
TABELLE 19. T-ZELLPOPULATIONEN VON P1B_M	56
TABELLE 20. TZR-POSITIVE T-ZELLEN VON P1B_M	56
TABELLE 21. LYMPHOZYTEN-PROLIFERATION VON P1B_M NACH STIMULATION (25 ½ JAHRE)	57
TABELLE 22. B-ZELLPOPULATIONEN VON P1B_M (25 ½ JAHRE)	57
TABELLE 23. IMMUNGLOBULINE VON P1B_M	57
TABELLE 24. LYMPHOZYTENPOPULATIONEN VON P1C_M (9 ¾ JAHRE)	59
TABELLE 25. T-ZELLPOPULATIONEN VON P1C_M (9 ¾ JAHRE)	59
TABELLE 26. TZR-POSITIVE T-ZELLEN VON P1C_M (9 ¾ JAHRE)	60
TABELLE 27. LYMPHOZYTEN-PROLIFERATION VON P1C_M NACH STIMULATION (9 ¾ JAHRE)	60
TABELLE 28. B-ZELLPOPULATIONEN VON P1C_M	60
TABELLE 29. IMMUNGLOBULINE VON P1C_M	61
TABELLE 30. LYMPHOZYTENPOPULATIONEN VON P1D_M	62
TABELLE 31. T-ZELLPOPULATIONEN VON P1D_M	62
TABELLE 32. TZR-POSITIVE T-ZELLEN VON P1D_M	63
TABELLE 33. LYMPHOZYTEN-PROLIFERATION VON P1D_M NACH STIMULATION	63
TABELLE 34. B-ZELLPOPULATIONEN VON P1D_M	63
TABELLE 35. IMMUNGLOBULINE VON P1D_M	64
TABELLE 36. QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER LÖSLICHEN FAKTOREN SGP130 UND SIL-6R MITTELS ELISA (CAU)	73
TABELLE 37. QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER LÖSLICHEN FAKTOREN SGP130 UND SIL-6R MITTELS ELISA VON MN1-3 (CAU)	76
TABELLE 38. NACHWEIS VON ANTI-IL-6-AAK IN GESUNDEN PROBANDEN	88
TABELLE 39. NACHWEIS VON ANTI-IL-6-AAK IN SERUMPRÄPARATEN	88
TABELLE 40. <i>IKBKG</i> -MUTATIONEN UND DEREN EINFLUSS AUF DIE PROTEINSTRUKTUR UND DEN KLINISCHEN PHÄNOTYP	111
TABELLE 41. IMMUNOLOGISCHE PARAMETER VON P1	122
TABELLE 42. IMMUNOLOGISCHE PARAMETER VON P2	123
TABELLE 43. IMMUNOLOGISCHE PARAMETER VON P3	124

11. Literaturverzeichnis

1. Heller, S., et al., *T Cell Impairment Is Predictive for a Severe Clinical Course in NEMO Deficiency*. J Clin Immunol, 2020.
2. Janeway, C.A., Jr., *How the immune system protects the host from infection*. Microbes Infect, 2001. **3**(13): p. 1167-71.
3. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
4. Kollmann, T.R., et al., *Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny*. Immunity, 2017. **46**(3): p. 350-363.
5. Trowsdale, J. and J.C. Knight, *Major histocompatibility complex genomics and human disease*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2013. **14**: p. 301-23.
6. Bachmann, M.F. and A. Oxenius, *Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again*. EMBO Rep, 2007. **8**(12): p. 1142-8.
7. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 445-89.
8. Saravia, J., N.M. Chapman, and H. Chi, *Helper T cell differentiation*. Cell Mol Immunol, 2019.
9. Paul, W.E. and J. Zhu, *How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(4): p. 225-35.
10. Yang, L., et al., *IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells*. Nature, 2008. **454**(7202): p. 350-2.
11. Li, Y., et al., *The Immunoregulation of Th17 in Host against Intracellular Bacterial Infection*. Mediators Inflamm, 2018. **2018**: p. 6587296.
12. Hale, J.S. and R. Ahmed, *Memory T follicular helper CD4 T cells*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 16.
13. Anderson, K.V., G. Jurgens, and C. Nusslein-Volhard, *Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product*. Cell, 1985. **42**(3): p. 779-89.
14. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
15. Lemaitre, B., *The road to Toll*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 521-7.
16. Gay, N.J. and F.J. Keith, *Drosophila Toll and IL-1 receptor*. Nature, 1991. **351**(6325): p. 355-6.
17. Heguy, A., et al., *Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the Drosophila toll protein are essential for IL-1R signal transduction*. J Biol Chem, 1992. **267**(4): p. 2605-9.
18. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
19. Botos, I., D.M. Segal, and D.R. Davies, *The structural biology of Toll-like receptors*. Structure, 2011. **19**(4): p. 447-59.
20. Regan, T., et al., *Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to Listeria monocytogenes in intestinal epithelial cells and macrophages*. J Immunol, 2013. **191**(12): p. 6084-92.

21. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. *Nature*, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
22. Zhang, S.Y., et al., *TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis*. *Science*, 2007. **317**(5844): p. 1522-7.
23. Bernard, J.J., et al., *Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3*. *Nat Med*, 2012. **18**(8): p. 1286-90.
24. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. *Science*, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
25. Shimazu, R., et al., *MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4*. *J Exp Med*, 1999. **189**(11): p. 1777-82.
26. Lee, C.C., A.M. Avalos, and H.L. Ploegh, *Accessory molecules for Toll-like receptors and their function*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(3): p. 168-79.
27. Hayashi, F., et al., *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*. *Nature*, 2001. **410**(6832): p. 1099-103.
28. Hemmi, H., et al., *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(2): p. 196-200.
29. Heil, F., et al., *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8*. *Science*, 2004. **303**(5663): p. 1526-9.
30. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. *Nature*, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
31. Barton, G.M., J.C. Kagan, and R. Medzhitov, *Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(1): p. 49-56.
32. Dinarello, C.A., *Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity*. *Immunol Rev*, 2018. **281**(1): p. 8-27.
33. Sims, J.E. and D.E. Smith, *The IL-1 family: regulators of immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(2): p. 89-102.
34. Garlanda, C., C.A. Dinarello, and A. Mantovani, *The interleukin-1 family: back to the future*. *Immunity*, 2013. **39**(6): p. 1003-18.
35. Muzio, M., et al., *The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)*. *J Exp Med*, 1998. **187**(12): p. 2097-101.
36. Muzio, M., et al., *IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling*. *Science*, 1997. **278**(5343): p. 1612-5.
37. De Nardo, D., et al., *Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) plays a dual role in myddosome formation and Toll-like receptor signaling*. *J Biol Chem*, 2018. **293**(39): p. 15195-15207.
38. Wesche, H., et al., *MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex*. *Immunity*, 1997. **7**(6): p. 837-47.
39. Horng, T., G.M. Barton, and R. Medzhitov, *TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(9): p. 835-41.
40. Yamamoto, M., et al., *Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling*. *J Immunol*, 2002. **169**(12): p. 6668-72.
41. Fitzgerald, K.A., et al., *LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF*. *J Exp Med*, 2003. **198**(7): p. 1043-55.

42. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
43. Kawasaki, T. and T. Kawai, *Toll-like receptor signaling pathways*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 461.
44. Chen, Z.J., *Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(8): p. 758-65.
45. Courtois, G. and A. Israel, *NF-kappa B defects in humans: the NEMO/incontinentia pigmenti connection*. Sci STKE, 2000. **2000**(58): p. pe1.
46. Puel, A., et al., *Inherited disorders of NF-kappaB-mediated immunity in man*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(1): p. 34-41.
47. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
48. Hoffmann, A., G. Natoli, and G. Ghosh, *Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6706-16.
49. Weissenbach, J., et al., *Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(12): p. 7152-6.
50. Sehgal, P.B. and A.D. Sagar, *Heterogeneity of poly(I) x poly(C)-induced human fibroblast interferon mRNA species*. Nature, 1980. **288**(5786): p. 95-7.
51. Content, J., et al., *Secretory proteins induced in human fibroblasts under conditions used for the production of interferon beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(9): p. 2768-72.
52. Haegeman, G., et al., *Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts*. Eur J Biochem, 1986. **159**(3): p. 625-32.
53. Hirano, T., et al., *Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(16): p. 5490-4.
54. Andus, T., et al., *Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells*. FEBS Lett, 1987. **221**(1): p. 18-22.
55. Gauldie, J., et al., *Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(20): p. 7251-5.
56. Baumann, H. and U. Muller-Eberhard, *Synthesis of hemopexin and cysteine protease inhibitor is coordinately regulated by HSF-II and interferon-beta 2 in rat hepatoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **146**(3): p. 1218-28.
57. Shabo, Y., et al., *The myeloid blood cell differentiation-inducing protein MGI-2A is interleukin-6*. Blood, 1988. **72**(6): p. 2070-3.
58. Poupart, P., et al., *B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein (BSF-2, HuIFN-beta 2, HPGF)*. EMBO J, 1987. **6**(5): p. 1219-24.
59. Yasukawa, K., et al., *Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene*. EMBO J, 1987. **6**(10): p. 2939-45.
60. Heinrich, P.C., J.V. Castell, and T. Andus, *Interleukin-6 and the acute phase response*. Biochem J, 1990. **265**(3): p. 621-36.

61. Hirano, T., et al., *Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin*. Nature, 1986. **324**(6092): p. 73-6.
62. Rose-John, S., et al., *Intracellular retention of interleukin-6 abrogates signaling*. J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 22084-91.
63. Bazan, J.F., *Neurotrophic cytokines in the hematopoietic fold*. Neuron, 1991. **7**(2): p. 197-208.
64. Somers, W., M. Stahl, and J.S. Seehra, *1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling*. EMBO J, 1997. **16**(5): p. 989-97.
65. Chalaris, A., et al., *The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(6-7): p. 484-94.
66. Wolf, J., S. Rose-John, and C. Garbers, *Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system*. Cytokine, 2014. **70**(1): p. 11-20.
67. Kishimoto, T., *B-cell stimulatory factors (BSFs): molecular structure, biological function, and regulation of expression*. J Clin Immunol, 1987. **7**(5): p. 343-55.
68. Okada, M., et al., *IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells*. J Immunol, 1988. **141**(5): p. 1543-9.
69. Habetswallner, D., et al., *Activation and proliferation of normal resting human T lymphocytes in serum-free culture: role of IL-4 and IL-6*. Immunology, 1988. **65**(3): p. 357-64.
70. Kimura, A. and T. Kishimoto, *IL-6: regulator of Treg/Th17 balance*. Eur J Immunol, 2010. **40**(7): p. 1830-5.
71. Tanaka, T. and T. Kishimoto, *Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(9): p. 1227-36.
72. Leary, A.G., et al., *Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: comparison with interleukin-1 alpha*. Blood, 1988. **71**(6): p. 1759-63.
73. Bot, F.J., et al., *Interleukin-6 synergizes with M-CSF in the formation of macrophage colonies from purified human marrow progenitor cells*. Blood, 1989. **73**(2): p. 435-7.
74. Caracciolo, D., S.C. Clark, and G. Rovera, *Human interleukin-6 supports granulocytic differentiation of hematopoietic progenitor cells and acts synergistically with GM-CSF*. Blood, 1989. **73**(3): p. 666-70.
75. Hirano, T. and T. Kishimoto, *Interleukin-6: possible implications in human diseases*. Ric Clin Lab, 1989. **19**(1): p. 1-10.
76. Castleman, B., L. Iverson, and V.P. Menendez, *Localized mediastinal lymphnode hyperplasia resembling thymoma*. Cancer, 1956. **9**(4): p. 822-30.
77. Yoshizaki, K., et al., *The Role of Interleukin-6 in Castleman Disease*. Hematol Oncol Clin North Am, 2018. **32**(1): p. 23-36.
78. Pardeo, M., C. Bracaglia, and F. De Benedetti, *Systemic juvenile idiopathic arthritis: New insights into pathogenesis and cytokine directed therapies*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2017. **31**(4): p. 505-516.
79. Lee, J.J.Y. and R. Schneider, *Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis*. Pediatr Clin North Am, 2018. **65**(4): p. 691-709.

80. Bergui, L., et al., *Interleukin 3 and interleukin 6 synergistically promote the proliferation and differentiation of malignant plasma cell precursors in multiple myeloma*. J Exp Med, 1989. **170**(2): p. 613-8.
81. Kishimoto, T., *IL-6: from its discovery to clinical applications*. Int Immunol, 2010. **22**(5): p. 347-52.
82. Abernethy, T.J. and O.T. Avery, *The Occurrence during Acute Infections of a Protein Not Normally Present in the Blood : I. Distribution of the Reactive Protein in Patients' Sera and the Effect of Calcium on the Flocculation Reaction with C Polysaccharide of Pneumococcus*. J Exp Med, 1941. **73**(2): p. 173-82.
83. Baumann, H. and J. Gauldie, *The acute phase response*. Immunol Today, 1994. **15**(2): p. 74-80.
84. Moshage, H., *Cytokines and the hepatic acute phase response*. J Pathol, 1997. **181**(3): p. 257-66.
85. Miller, L.L., et al., *The dominant role of the liver in plasma protein synthesis; a direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-epsilon-C14*. J Exp Med, 1951. **94**(5): p. 431-53.
86. Kuscuoglu, D., et al., *Liver - master and servant of serum proteome*. J Hepatol, 2018. **69**(2): p. 512-524.
87. Taga, T. and T. Kishimoto, *Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 797-819.
88. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
89. O'Shea, J.J., et al., *The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention*. Annu Rev Med, 2015. **66**: p. 311-28.
90. Busca, R., J. Pouyssegur, and P. Lenormand, *ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy?* Front Cell Dev Biol, 2016. **4**: p. 53.
91. Janku, F., T.A. Yap, and F. Meric-Bernstam, *Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway?* Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(5): p. 273-291.
92. Rose-John, S., *Interleukin-6 Family Cytokines*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(2).
93. Lambrecht, B.N., M. Vanderkerken, and H. Hammad, *The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity*. Nat Rev Immunol, 2018.
94. Calabrese, L.H. and S. Rose-John, *IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease*. Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(12): p. 720-7.
95. Garbers, C., S. Aparicio-Siegmund, and S. Rose-John, *The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition*. Curr Opin Immunol, 2015. **34**: p. 75-82.
96. Rose-John, S. and P.C. Heinrich, *Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function*. Biochem J, 1994. **300** (Pt 2): p. 281-90.
97. Romano, M., et al., *Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment*. Immunity, 1997. **6**(3): p. 315-25.
98. Klouche, M., et al., *Novel path to activation of vascular smooth muscle cells: up-regulation of gp130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor*. J Immunol, 1999. **163**(8): p. 4583-9.
99. Wang, X.P., et al., *The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis*. J Invest Dermatol, 2004. **123**(1): p. 124-31.

100. Bottcher, J.P., et al., *IL-6 trans-signaling-dependent rapid development of cytotoxic CD8+ T cell function*. Cell Rep, 2014. **8**(5): p. 1318-27.
101. Boulanger, M.J., et al., *Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex*. Science, 2003. **300**(5628): p. 2101-4.
102. Lacroix, M., et al., *Novel Insights into Interleukin 6 (IL-6) Cis- and Trans-signaling Pathways by Differentially Manipulating the Assembly of the IL-6 Signaling Complex*. J Biol Chem, 2015. **290**(45): p. 26943-53.
103. Fudenberg, H.H., et al., *Classification of the primary immune deficiencies: WHO recommendation*. N Engl J Med, 1970. **283**(12): p. 656-7.
104. Picard, C., et al., *International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity*. J Clin Immunol, 2018. **38**(1): p. 96-128.
105. Bousfiha, A., et al., *The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies*. J Clin Immunol, 2018. **38**(1): p. 129-143.
106. Minegishi, Y., et al., *Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome*. Nature, 2007. **448**(7157): p. 1058-62.
107. Holland, S.M., et al., *STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome*. N Engl J Med, 2007. **357**(16): p. 1608-19.
108. Smahi, A., et al., *Genomic rearrangement in NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 466-72.
109. Nagamine, K., et al., *Positional cloning of the APECED gene*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 393-8.
110. Picard, C., et al., *Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency*. Science, 2003. **299**(5615): p. 2076-9.
111. von Bernuth, H., et al., *Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency*. Science, 2008. **321**(5889): p. 691-6.
112. Picard, C., J.L. Casanova, and A. Puel, *Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or IkappaBalpha deficiency*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(3): p. 490-7.
113. Newport, M.J., et al., *A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection*. N Engl J Med, 1996. **335**(26): p. 1941-9.
114. Puel, A., et al., *Recurrent staphylococcal cellulitis and subcutaneous abscesses in a child with autoantibodies against IL-6*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 647-54.
115. Nanki, T., et al., *Suppression of elevations in serum C reactive protein levels by anti-IL-6 autoantibodies in two patients with severe bacterial infections*. Ann Rheum Dis, 2013. **72**(6): p. 1100-2.
116. Cordier, F., et al., *The zinc finger of NEMO is a functional ubiquitin-binding domain*. J Biol Chem, 2009. **284**(5): p. 2902-7.
117. Hanson, E.P., et al., *Hypomorphic nuclear factor-kappaB essential modulator mutation database and reconstitution system identifies phenotypic and immunologic diversity*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(6): p. 1169-1177 e16.
118. Zonana, J., et al., *A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-gamma (NEMO)*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(6): p. 1555-62.

119. Rudolph, D., et al., *Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice*. Genes Dev, 2000. **14**(7): p. 854-62.
120. Frix, C.D., 3rd and D.M. Bronson, *Acute miliary tuberculosis in a child with anhidrotic ectodermal dysplasia*. Pediatr Dermatol, 1986. **3**(6): p. 464-7.
121. Kosaki, K., et al., *Female patient showing hypohidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency (HED-ID)*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(3): p. 664-6.
122. Kawai, T., et al., *Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency*. Blood, 2012. **119**(23): p. 5458-66.
123. Fusco, F., et al., *EDA-ID and IP, two faces of the same coin: how the same IKBKG/NEMO mutation affecting the NF-kappaB pathway can cause immunodeficiency and/or inflammation*. Int Rev Immunol, 2015. **34**(6): p. 445-59.
124. Jain, A., et al., *Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohidrotic ectodermal dysplasia*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 223-8.
125. Orange, J.S., et al., *Deficient natural killer cell cytotoxicity in patients with IKK-gamma/NEMO mutations*. J Clin Invest, 2002. **109**(11): p. 1501-9.
126. Mansour, S., et al., *Incontinentia pigmenti in a surviving male is accompanied by hypohidrotic ectodermal dysplasia and recurrent infection*. Am J Med Genet, 2001. **99**(2): p. 172-7.
127. Dupuis-Girod, S., et al., *Osteopetrosis, lymphedema, anhidrotic ectodermal dysplasia, and immunodeficiency in a boy and incontinentia pigmenti in his mother*. Pediatrics, 2002. **109**(6): p. e97.
128. Miot, C., et al., *Hematopoietic stem cell transplantation in 29 patients hemizygous for hypomorphic IKBKG/NEMO mutations*. Blood, 2017. **130**(12): p. 1456-1467.
129. Burgess, A.W. and D. Metcalf, *The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors*. Blood, 1980. **56**(6): p. 947-58.
130. Lee, F., et al., *Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(13): p. 4360-4.
131. Dirksen, U., et al., *Human pulmonary alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor common beta chain expression*. J Clin Invest, 1997. **100**(9): p. 2211-7.
132. Suzuki, T., et al., *Familial pulmonary alveolar proteinosis caused by mutations in CSF2RA*. J Exp Med, 2008. **205**(12): p. 2703-10.
133. Griesse, M., *Pulmonary Alveolar Proteinosis: A Comprehensive Clinical Perspective*. Pediatrics, 2017. **140**(2).
134. Martinez-Moczygemba, M., et al., *Pulmonary alveolar proteinosis caused by deletion of the GM-CSFRalpha gene in the X chromosome pseudoautosomal region 1*. J Exp Med, 2008. **205**(12): p. 2711-6.
135. Tanaka, N., et al., *Lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis express a factor which neutralizes granulocyte-macrophage colony stimulating factor*. FEBS Lett, 1999. **442**(2-3): p. 246-50.
136. Kitamura, T., et al., *Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*. J Exp Med, 1999. **190**(6): p. 875-80.

137. Kumar, A., et al., *Pulmonary alveolar proteinosis in adults: pathophysiology and clinical approach*. Lancet Respir Med, 2018. **6**(7): p. 554-565.
138. Rosen, S.H., B. Castleman, and A.A. Liebow, *Pulmonary alveolar proteinosis*. N Engl J Med, 1958. **258**(23): p. 1123-42.
139. Rosen, L.B., et al., *Anti-GM-CSF autoantibodies in patients with cryptococcal meningitis*. J Immunol, 2013. **190**(8): p. 3959-66.
140. Rosen, L.B., et al., *Nocardia-induced granulocyte macrophage colony-stimulating factor is neutralized by autoantibodies in disseminated/extrapulmonary nocardiosis*. Clin Infect Dis, 2015. **60**(7): p. 1017-25.
141. Watanabe, M., et al., *Anti-cytokine autoantibodies are ubiquitous in healthy individuals*. FEBS Lett, 2007. **581**(10): p. 2017-21.
142. Uchida, K., et al., *Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor autoantibodies and myeloid cell immune functions in healthy subjects*. Blood, 2009. **113**(11): p. 2547-56.
143. Chapman, S.J. and A.V. Hill, *Human genetic susceptibility to infectious disease*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(3): p. 175-88.
144. Bustamante, J., et al., *Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN-gamma immunity*. Semin Immunol, 2014. **26**(6): p. 454-70.
145. Rosain, J., et al., *Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: 2014-2018 update*. Immunol Cell Biol, 2018.
146. Al-Muhsen, S. and J.L. Casanova, *The genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(6): p. 1043-51; quiz 1052-3.
147. Hoflich, C., et al., *Naturally occurring anti-IFN-gamma autoantibody and severe infections with Mycobacterium chelonae and Burkholderia coccovenans*. Blood, 2004. **103**(2): p. 673-5.
148. Doffinger, R., et al., *Autoantibodies to interferon-gamma in a patient with selective susceptibility to mycobacterial infection and organ-specific autoimmunity*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(1): p. e10-4.
149. Browne, S.K., et al., *Adult-onset immunodeficiency in Thailand and Taiwan*. N Engl J Med, 2012. **367**(8): p. 725-34.
150. Chi, C.Y., et al., *Clinical manifestations, course, and outcome of patients with neutralizing anti-interferon-gamma autoantibodies and disseminated nontuberculous mycobacterial infections*. Medicine (Baltimore), 2016. **95**(25): p. e3927.
151. Kampmann, B., et al., *Acquired predisposition to mycobacterial disease due to autoantibodies to IFN-gamma*. J Clin Invest, 2005. **115**(9): p. 2480-8.
152. O'Connell, E., et al., *The first US domestic report of disseminated Mycobacterium avium complex and anti-interferon-gamma autoantibodies*. J Clin Immunol, 2014. **34**(8): p. 928-32.
153. Hanitsch, L.G., et al., *Late-Onset Disseminated Mycobacterium avium intracellulare Complex Infection (MAC), Cerebral Toxoplasmosis and Salmonella Sepsis in a German Caucasian Patient with Unusual Anti-Interferon-Gamma IgG1 Autoantibodies*. J Clin Immunol, 2015. **35**(4): p. 361-5.

154. Chi, C.Y., et al., *Anti-IFN-gamma autoantibodies in adults with disseminated nontuberculous mycobacterial infections are associated with HLA-DRB1*16:02 and HLA-DQB1*05:02 and the reactivation of latent varicella-zoster virus infection.* Blood, 2013. **121**(8): p. 1357-66.
155. Pithukpakorn, M., et al., *HLA-DRB1 and HLA-DQB1 Are Associated with Adult-Onset Immunodeficiency with Acquired Anti-Interferon-Gamma Autoantibodies.* PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0128481.
156. Ku, C.L., et al., *Anti-IFN-gamma autoantibodies are strongly associated with HLA-DR*15:02/16:02 and HLA-DQ*05:01/05:02 across Southeast Asia.* J Allergy Clin Immunol, 2016. **137**(3): p. 945-8 e8.
157. Lin, C.H., et al., *Identification of a major epitope by anti-interferon-gamma autoantibodies in patients with mycobacterial disease.* Nat Med, 2016. **22**(9): p. 994-1001.
158. Ross, C., et al., *Autoantibodies to crude human leucocyte interferon (IFN), native human IFN, recombinant human IFN-alpha 2b and human IFN-gamma in healthy blood donors.* Clin Exp Immunol, 1990. **82**(1): p. 57-62.
159. Matsuzaki, G. and M. Umemura, *Interleukin-17 family cytokines in protective immunity against infections: role of hematopoietic cell-derived and non-hematopoietic cell-derived interleukin-17s.* Microbiol Immunol, 2018. **62**(1): p. 1-13.
160. de Beaucoudrey, L., et al., *Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells.* J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1543-50.
161. Puel, A., et al., *Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity.* Science, 2011. **332**(6025): p. 65-8.
162. Puel, A., et al., *Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis.* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2012. **12**(6): p. 616-22.
163. Puel, A., et al., *Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I.* J Exp Med, 2010. **207**(2): p. 291-7.
164. Kisand, K., et al., *Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines.* J Exp Med, 2010. **207**(2): p. 299-308.
165. Rose-John, S., K. Winthrop, and L. Calabrese, *The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications.* Nat Rev Rheumatol, 2017. **13**(7): p. 399-409.
166. Courtois, G., et al., *A hypermorphic IkappaBalpha mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency.* J Clin Invest, 2003. **112**(7): p. 1108-15.
167. Spencer, S., et al., *Loss of the interleukin-6 receptor causes immunodeficiency, atopy, and abnormal inflammatory responses.* J Exp Med, 2019. **216**(9): p. 1986-1998.
168. Nahum, A., et al., *Defining the biological responses of IL-6 by the study of a novel IL-6 receptor chain (IL6R) immunodeficiency.* J Allergy Clin Immunol, 2019.
169. Schwerd, T., et al., *A biallelic mutation in IL6ST encoding the GP130 co-receptor causes immunodeficiency and craniosynostosis.* J Exp Med, 2017. **214**(9): p. 2547-2562.

170. Beziat, V., et al., *A recessive form of hyper-IgE syndrome by disruption of ZNF341-dependent STAT3 transcription and activity*. Sci Immunol, 2018. **3**(24).
171. Homann, C., et al., *Anti-interleukin-6 autoantibodies in plasma are associated with an increased frequency of infections and increased mortality of patients with alcoholic cirrhosis*. Scand J Immunol, 1996. **44**(6): p. 623-9.
172. Browne, S.K., *Anticytokine autoantibody-associated immunodeficiency*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 635-57.
173. Daya-Grosjean, L., et al., *An immortalized xeroderma pigmentosum, group C, cell line which replicates SV40 shuttle vectors*. Mutat Res, 1987. **183**(2): p. 185-96.
174. Lek, M., et al., *Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans*. Nature, 2016. **536**(7616): p. 285-91.
175. Rosenberg, J.M., et al., *Protein microarrays identify disease-specific anti-cytokine autoantibody profiles in the landscape of immunodeficiency*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **137**(1): p. 204-213 e3.
176. Schatorje, E.J., et al., *Paediatric reference values for the peripheral T cell compartment*. Scand J Immunol, 2012. **75**(4): p. 436-44.
177. Quah, B.J. and C.R. Parish, *The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation*. J Vis Exp, 2010(44).
178. Ku, C.L., et al., *NEMO mutations in 2 unrelated boys with severe infections and conical teeth*. Pediatrics, 2005. **115**(5): p. e615-9.
179. Filipe-Santos, O., et al., *X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1745-59.
180. Ding, L., et al., *Determination of human anticytokine autoantibody profiles using a particle-based approach*. J Clin Immunol, 2012. **32**(2): p. 238-45.
181. Shifera, A.S., *The zinc finger domain of IKKgamma (NEMO) protein in health and disease*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(10): p. 2404-14.
182. Pachlopnik Schmid, J.M., et al., *Transient hemophagocytosis with deficient cellular cytotoxicity, monoclonal immunoglobulin M gammopathy, increased T-cell numbers, and hypomorphic NEMO mutation*. Pediatrics, 2006. **117**(5): p. e1049-56.
183. Orange, J.S., et al., *The presentation and natural history of immunodeficiency caused by nuclear factor kappaB essential modulator mutation*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(4): p. 725-33.
184. Orange, J.S., et al., *Human nuclear factor kappa B essential modulator mutation can result in immunodeficiency without ectodermal dysplasia*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(3): p. 650-6.
185. Johnston, A.M., et al., *A Novel Mutation in IKBKG/NEMO Leads to Ectodermal Dysplasia with Severe Immunodeficiency (EDA-ID)*. J Clin Immunol, 2016. **36**(6): p. 541-3.
186. Picard, C., et al., *Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency*. Medicine (Baltimore), 2010. **89**(6): p. 403-25.
187. Boisson, B., et al., *Human IkappaBalpha Gain of Function: a Severe and Syndromic Immunodeficiency*. J Clin Immunol, 2017. **37**(5): p. 397-412.
188. Janssen, R., et al., *The same IkappaBalpha mutation in two related individuals leads to completely different clinical syndromes*. J Exp Med, 2004. **200**(5): p. 559-68.

189. Schimke, L.F., et al., *A novel gain-of-function IKBA mutation underlies ectodermal dysplasia with immunodeficiency and polyendocrinopathy*. J Clin Immunol, 2013. **33**(6): p. 1088-99.
190. Yoshioka, T., et al., *Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency caused by a novel NFKBIA mutation, p.Ser36Tyr, presents with mild ectodermal dysplasia and non-infectious systemic inflammation*. J Clin Immunol, 2013. **33**(7): p. 1165-74.
191. Petersheim, D., et al., *Mechanisms of genotype-phenotype correlation in autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia with immune deficiency*. J Allergy Clin Immunol, 2018. **141**(3): p. 1060-1073 e3.
192. Roifman, C.M., *Hematopoietic stem cell transplantation for profound T-cell deficiency (combined immunodeficiency)*. Immunol Allergy Clin North Am, 2010. **30**(2): p. 209-19.
193. Nei, T., et al., *Light chain (kappa/lambda) ratio of GM-CSF autoantibodies is associated with disease severity in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis*. Clin Immunol, 2013. **149**(3): p. 357-64.
194. Sarkadi, A.K., et al., *Autoantibodies to IL-17A may be correlated with the severity of mucocutaneous candidiasis in APECED patients*. J Clin Immunol, 2014. **34**(2): p. 181-93.
195. Vogel, T.P., J.D. Milner, and M.A. Cooper, *The Ying and Yang of STAT3 in Human Disease*. J Clin Immunol, 2015. **35**(7): p. 615-23.
196. Hansen, M.B., et al., *Anti-interleukin-6 antibodies in normal human serum*. Scand J Immunol, 1991. **33**(6): p. 777-81.
197. Hansen, M.B., et al., *High-affinity IgG autoantibodies to IL-6 in sera of normal individuals are competitive inhibitors of IL-6 in vitro*. Cytokine, 1993. **5**(1): p. 72-80.
198. Galle, P., et al., *High levels of neutralizing IL-6 autoantibodies in 0.1% of apparently healthy blood donors*. Eur J Immunol, 2004. **34**(11): p. 3267-75.
199. Hansen, M.B., et al., *Influence of interleukin-6 (IL-6) autoantibodies on IL-6 binding to cellular receptors*. Eur J Immunol, 1995. **25**(2): p. 348-54.
200. von Stemmann, J.H., et al., *Prevalence and correlation of cytokine-specific autoantibodies with epidemiological factors and C-reactive protein in 8,972 healthy individuals: Results from the Danish Blood Donor Study*. PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0179981.
201. Takemura, H., et al., *Anti-interleukin-6 autoantibodies in rheumatic diseases. Increased frequency in the sera of patients with systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(8): p. 940-3.
202. Hansen, M.B., et al., *Cytokine autoantibodies in rheumatoid arthritis*. Scand J Rheumatol, 1995. **24**(4): p. 197-203.
203. Fosgerau, K., et al., *Interleukin-6 autoantibodies are involved in the pathogenesis of a subset of type 2 diabetes*. J Endocrinol, 2010. **204**(3): p. 265-73.
204. Burbelo, P.D., et al., *Anti-cytokine autoantibodies are associated with opportunistic infection in patients with thymic neoplasia*. Blood, 2010. **116**(23): p. 4848-58.
205. Svenson, M., M.B. Hansen, and K. Bendtzen, *Binding of cytokines to pharmaceutically prepared human immunoglobulin*. J Clin Invest, 1993. **92**(5): p. 2533-9.

206. Ross, C., et al., *Increased in vivo antibody activity against interferon alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-6 after high-dose Ig therapy*. *Blood*, 1997. **90**(6): p. 2376-80.
207. Orłowski, R.Z., et al., *A phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled study of siltuximab (anti-IL-6 mAb) and bortezomib versus bortezomib alone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma*. *Am J Hematol*, 2015. **90**(1): p. 42-9.
208. Takeuchi, T., et al., *Efficacy and safety of olokizumab in Asian patients with moderate-to-severe rheumatoid arthritis, previously exposed to anti-TNF therapy: Results from a randomized phase II trial*. *Mod Rheumatol*, 2016. **26**(1): p. 15-23.
209. Aletaha, D., et al., *Efficacy and safety of sirukumab in patients with active rheumatoid arthritis refractory to anti-TNF therapy (SIRROUND-T): a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, multinational, phase 3 study*. *Lancet*, 2017. **389**(10075): p. 1206-1217.
210. Ishiguro, N., et al., *Effectiveness and safety of tocilizumab in achieving clinical and functional remission, and sustaining efficacy in biologics-naïve patients with rheumatoid arthritis: The FIRST Bio study*. *Mod Rheumatol*, 2017. **27**(2): p. 217-226.
211. Burmester, G.R., et al., *Efficacy and safety of sarilumab monotherapy versus adalimumab monotherapy for the treatment of patients with active rheumatoid arthritis (MONARCH): a randomised, double-blind, parallel-group phase III trial*. *Ann Rheum Dis*, 2017. **76**(5): p. 840-847.
212. Shaw, S., et al., *Discovery and characterization of olokizumab: a humanized antibody targeting interleukin-6 and neutralizing gp130-signaling*. *MAbs*, 2014. **6**(3): p. 774-82.
213. Genovese, M.C., et al., *Sarilumab Plus Methotrexate in Patients With Active Rheumatoid Arthritis and Inadequate Response to Methotrexate: Results of a Phase III Study*. *Arthritis Rheumatol*, 2015. **67**(6): p. 1424-37.
214. Shulman, S.T., et al., *Streptococcal pharyngitis: the case for penicillin therapy*. *Pediatr Infect Dis J*, 1994. **13**(1): p. 1-7.
215. Robinson, J., *Colonization and infection of the respiratory tract: What do we know?* *Paediatr Child Health*, 2004. **9**(1): p. 21-4.
216. Satzke, C., et al., *Standard method for detecting upper respiratory carriage of Streptococcus pneumoniae: updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group*. *Vaccine*, 2013. **32**(1): p. 165-79.
217. Adegbola, R.A., et al., *Carriage of Streptococcus pneumoniae and other respiratory bacterial pathogens in low and lower-middle income countries: a systematic review and meta-analysis*. *PLoS One*, 2014. **9**(8): p. e103293.
218. Loughran, A.J., C.J. Orihuela, and E.I. Tuomanen, *Streptococcus pneumoniae: Invasion and Inflammation*. *Microbiol Spectr*, 2019. **7**(2).
219. Bert, F., et al., *Association between nasal carriage of Staphylococcus aureus and infection in liver transplant recipients*. *Clin Infect Dis*, 2000. **31**(5): p. 1295-9.
220. Mertz, D., et al., *Exclusive Staphylococcus aureus throat carriage: at-risk populations*. *Arch Intern Med*, 2009. **169**(2): p. 172-8.
221. Verhoeven, P.O., et al., *Detection and clinical relevance of Staphylococcus aureus nasal carriage: an update*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2014. **12**(1): p. 75-89.

-
222. Mooster, J.L., et al., *Immune deficiency caused by impaired expression of nuclear factor-kappaB essential modifier (NEMO) because of a mutation in the 5' untranslated region of the NEMO gene*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(1): p. 127-32 e7.
223. Hsu, A.P., et al., *IKBKG (NEMO) 5' Untranslated Splice Mutations Lead to Severe, Chronic Disseminated Mycobacterial Infections*. Clin Infect Dis, 2018. **67**(3): p. 456-459.
224. Ne, K., et al., *Disseminated BCG Infectious Disease and Hyperferritinemia in a Patient With a Novel NEMO Mutation*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2016. **26**(4): p. 268-271.
225. Niehues, T., et al., *Nuclear factor kappaB essential modulator-deficient child with immunodeficiency yet without anhidrotic ectodermal dysplasia*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(6): p. 1456-62.
226. Courtois, G. and T.D. Gilmore, *Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6831-43.
227. Puel, A., et al., *The NEMO mutation creating the most-upstream premature stop codon is hypomorphic because of a reinitiation of translation*. Am J Hum Genet, 2006. **78**(4): p. 691-701.
228. Aradhya, S., et al., *Atypical forms of incontinentia pigmenti in male individuals result from mutations of a cytosine tract in exon 10 of NEMO (IKK-gamma)*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(3): p. 765-71.
229. Fusco, F., et al., *Alterations of the IKBKG locus and diseases: an update and a report of 13 novel mutations*. Hum Mutat, 2008. **29**(5): p. 595-604.
230. Fusco, F., et al., *Molecular analysis of the genetic defect in a large cohort of IP patients and identification of novel NEMO mutations interfering with NF-kappaB activation*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(16): p. 1763-73.
231. Keller, M.D., et al., *Hypohidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency with coincident NEMO and EDA mutations*. Front Immunol, 2011. **2**: p. 61.
232. Frans, G., et al., *Functional Evaluation of an IKBKG Variant Suspected to Cause Immunodeficiency Without Ectodermal Dysplasia*. J Clin Immunol, 2017. **37**(8): p. 801-810.
233. Salt, B.H., et al., *IKBKG (nuclear factor-kappa B essential modulator) mutation can be associated with opportunistic infection without impairing Toll-like receptor function*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(4): p. 976-82.
234. Abbott, J.K., et al., *Successful hematopoietic cell transplantation in patients with unique NF-kappaB essential modulator (NEMO) mutations*. Bone Marrow Transplant, 2014. **49**(11): p. 1446-7.
235. Wu, S., et al., *Use of enteral immunoglobulin in NEMO syndrome for eradication of persistent symptomatic norovirus enteritis*. J Allergy Clin Immunol Pract, 2016. **4**(3): p. 539-541 e1.
236. Fusco, F., et al., *Unusual Father-to-Daughter Transmission of Incontinentia Pigmenti Due to Mosaicism in IP Males*. Pediatrics, 2017. **140**(3).
237. Kenwrick, S., et al., *Survival of male patients with incontinentia pigmenti carrying a lethal mutation can be explained by somatic mosaicism or Klinefelter syndrome*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(6): p. 1210-7.

-
238. Lee, N.C., et al., *Pseudogene-derived IKBKG gene mutations in incontinentia pigmenti*. Clin Genet, 2009. **76**(4): p. 417-9.
239. Fryssira, H., et al., *Incontinentia pigmenti revisited. A novel nonsense mutation of the IKBKG gene*. Acta Paediatr, 2011. **100**(1): p. 128-33.
240. Ghedira, N., et al., *Clinical profile of comorbidity of rare diseases in a Tunisian patient: a case report associating incontinentia pigmenti and Noonan syndrome*. BMC Pediatr, 2018. **18**(1): p. 286.
241. Matsuzaki, Y., et al., *Incontinentia pigmenti in a male (XY) infant with long-term follow up over 8 years*. J Dermatol, 2018. **45**(1): p. 100-103.
242. Orstavik, K.H., et al., *Novel splicing mutation in the NEMO (IKK-gamma) gene with severe immunodeficiency and heterogeneity of X-chromosome inactivation*. Am J Med Genet A, 2006. **140**(1): p. 31-9.
243. Fish, J.D., et al., *Challenges in the use of allogeneic hematopoietic SCT for ectodermal dysplasia with immune deficiency*. Bone Marrow Transplant, 2009. **43**(3): p. 217-21.
244. Bal, E., et al., *Lack of interaction between NEMO and SHARPIN impairs linear ubiquitination and NF-kappaB activation and leads to incontinentia pigmenti*. J Allergy Clin Immunol, 2017. **140**(6): p. 1671-1682 e2.
245. Danescu, S., et al., *A novel IKBKG mutation in a patient with incontinentia pigmenti and features of hepatic ciliopathy*. Australas J Dermatol, 2018. **59**(4): p. e262-e265.
246. Devora, G.A., et al., *A novel missense mutation in the nuclear factor-kappaB essential modulator (NEMO) gene resulting in impaired activation of the NF-kappaB pathway and a unique clinical phenotype presenting as MRSA subdural empyema*. J Clin Immunol, 2010. **30**(6): p. 881-5.
247. Orange, J.S., O. Levy, and R.S. Geha, *Human disease resulting from gene mutations that interfere with appropriate nuclear factor-kappaB activation*. Immunol Rev, 2005. **203**: p. 21-37.
248. Pai, S.Y., et al., *Allogeneic transplantation successfully corrects immune defects, but not susceptibility to colitis, in a patient with nuclear factor-kappaB essential modulator deficiency*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(6): p. 1113-1118 e1.
249. Mizukami, T., et al., *Successful treatment with infliximab for inflammatory colitis in a patient with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency*. J Clin Immunol, 2012. **32**(1): p. 39-49.
250. Ku, C.L., et al., *IRAK4 and NEMO mutations in otherwise healthy children with recurrent invasive pneumococcal disease*. J Med Genet, 2007. **44**(1): p. 16-23.
251. Jorgensen, S.E., et al., *Ectodermal dysplasia with immunodeficiency caused by a branch-point mutation in IKBKG/NEMO*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **138**(6): p. 1706-1709 e4.
252. Yu, J.C., et al., *Innate Immunity of Neonates and Infants*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1759.
253. Abinun, M., et al., *Anhidrotic ectodermal dysplasia associated with specific antibody deficiency*. Eur J Pediatr, 1996. **155**(2): p. 146-7.
254. Doffinger, R., et al., *X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling*. Nat Genet, 2001. **27**(3): p. 277-85.

255. Klemann, C., et al., *Transplantation from a symptomatic carrier sister restores host defenses but does not prevent colitis in NEMO deficiency*. Clin Immunol, 2016. **164**: p. 52-6.
256. Minic, S., D. Trpinac, and M. Obradovic, *A Novel Frameshift Mutation of the IKBKG Gene Causing Typical Incontinentia Pigmenti*. Srp Arh Celok Lek, 2015. **143**(11-12): p. 752-4.
257. Lee, W.I., et al., *Molecular analysis of a large cohort of patients with the hyper immunoglobulin M (IgM) syndrome*. Blood, 2005. **105**(5): p. 1881-90.
258. Karamchandani-Patel, G., et al., *Congenital alterations of NEMO glutamic acid 223 result in hypohidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency with normal serum IgG levels*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2011. **107**(1): p. 50-6.
259. Nishikomori, R., et al., *X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency caused by reversion mosaicism of NEMO reveals a critical role for NEMO in human T-cell development and/or survival*. Blood, 2004. **103**(12): p. 4565-72.
260. Schweizer, P., et al., *[Polysaccharide specific humoral immunodeficiency in ectodermal dysplasia. Case report of a boy with two affected brothers]*. Klin Padiatr, 1999. **211**(6): p. 459-61.
261. Haverkamp, M.H., et al., *Correlating interleukin-12 stimulated interferon-gamma production and the absence of ectodermal dysplasia and anhidrosis (EDA) in patients with mutations in NF-kappaB essential modulator (NEMO)*. J Clin Immunol, 2014. **34**(4): p. 436-43.
262. Chandrakasan, S., et al., *Outcome of patients with NEMO deficiency following allogeneic hematopoietic cell transplant*. J Allergy Clin Immunol, 2017. **139**(3): p. 1040-1043 e2.
263. Martinez-Pomar, N., et al., *A new mutation in exon 7 of NEMO gene: late skewed X-chromosome inactivation in an incontinentia pigmenti female patient with immunodeficiency*. Hum Genet, 2005. **118**(3-4): p. 458-65.
264. Ramirez-Alejo, N., et al., *Novel hypomorphic mutation in IKBKG impairs NEMO-ubiquitylation causing ectodermal dysplasia, immunodeficiency, incontinentia pigmenti, and immune thrombocytopenic purpura*. Clin Immunol, 2015. **160**(2): p. 163-71.
265. Li, M., et al., *Incontinentia pigmenti in a Japanese female infant with a novel frame-shift mutation in the IKBKG gene*. J Dermatol, 2019. **46**(1): p. e26-e28.
266. Hubeau, M., et al., *New mechanism of X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency: impairment of ubiquitin binding despite normal folding of NEMO protein*. Blood, 2011. **118**(4): p. 926-35.
267. Imamura, M., et al., *Disseminated BCG infection mimicking metastatic nasopharyngeal carcinoma in an immunodeficient child with a novel hypomorphic NEMO mutation*. J Clin Immunol, 2011. **31**(5): p. 802-10.
268. Hull, S., et al., *Somatic mosaicism of a novel IKBKG mutation in a male patient with incontinentia pigmenti*. Am J Med Genet A, 2015. **167**(7): p. 1601-4.
269. Filipe-Santos, O., et al., *Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features*. Semin Immunol, 2006. **18**(6): p. 347-61.

-
270. Sebban-Benin, H., et al., *Identification of TRAF6-dependent NEMO polyubiquitination sites through analysis of a new NEMO mutation causing incontinentia pigmenti*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(23): p. 2805-15.
 271. Sitton, J.E. and E.L. Reimund, *Extramedullary hematopoiesis of the cranial dura and anhidrotic ectodermal dysplasia*. Neuropediatrics, 1992. **23**(2): p. 108-10.
 272. Tono, C., et al., *Correction of immunodeficiency associated with NEMO mutation by umbilical cord blood transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen*. Bone Marrow Transplant, 2007. **39**(12): p. 801-4.
 273. Chang, T.T., et al., *A male infant with anhidrotic ectodermal dysplasia/immunodeficiency accompanied by incontinentia pigmenti and a mutation in the NEMO pathway*. J Am Acad Dermatol, 2008. **58**(2): p. 316-20.
 274. Mancini, A.J., L.P. Lawley, and G. Uzel, *X-linked ectodermal dysplasia with immunodeficiency caused by NEMO mutation: early recognition and diagnosis*. Arch Dermatol, 2008. **144**(3): p. 342-6.
 275. Ohnishi, H., et al., *Immunodeficiency in Two Female Patients with Incontinentia Pigmenti with Heterozygous NEMO Mutation Diagnosed by LPS Unresponsiveness*. J Clin Immunol, 2017. **37**(6): p. 529-538.
 276. Cheng, L.E., et al., *Persistent systemic inflammation and atypical enterocolitis in patients with NEMO syndrome*. Clin Immunol, 2009. **132**(1): p. 124-31.
 277. Roberts, J.L., et al., *Incontinentia pigmenti in a newborn male infant with DNA confirmation*. Am J Med Genet, 1998. **75**(2): p. 159-63.
 278. Makris, C., J.L. Roberts, and M. Karin, *The carboxyl-terminal region of IkappaB kinase gamma (IKKgamm) is required for full IKK activation*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(18): p. 6573-81.
 279. Roberts, C.M., et al., *A novel NEMO gene mutation causing osteopetrosis, lymphoedema, hypohidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency (OL-HED-ID)*. Eur J Pediatr, 2010. **169**(11): p. 1403-7.
 280. Takada, H., et al., *NEMO mutation as a cause of familial occurrence of Behcet's disease in female patients*. Clin Genet, 2010. **78**(6): p. 575-9.
 281. Ricci, S., et al., *OL-EDA-ID Syndrome: a Novel Hypomorphic NEMO Mutation Associated with a Severe Clinical Presentation and Transient HLH*. J Clin Immunol, 2017. **37**(1): p. 7-11.
 282. Boisson, B., et al., *Rescue of recurrent deep intronic mutation underlying cell type-dependent quantitative NEMO deficiency*. J Clin Invest, 2019. **129**(2): p. 583-597.
 283. Karakawa, S., et al., *Decreased expression in nuclear factor-kappaB essential modulator due to a novel splice-site mutation causes X-linked ectodermal dysplasia with immunodeficiency*. J Clin Immunol, 2011. **31**(5): p. 762-72.
 284. Gupta, S., et al., *Distinct Functions of Autoantibodies Against Interferon in Systemic Lupus Erythematosus: A Comprehensive Analysis of Anticytokine Autoantibodies in Common Rheumatic Diseases*. Arthritis Rheumatol, 2016. **68**(7): p. 1677-87.
 285. Ferre, E.M., et al., *Redefined clinical features and diagnostic criteria in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*. JCI Insight, 2016. **1**(13).

12. Appendix

12.1. Klinische und immunologische Präsentation von Patienten mit *IKBKG*-Mutationen

Tabelle 40. *IKBKG*-Mutationen und deren Einfluss auf die Proteinstruktur und den klinischen Phänotyp

Position (Protein)	Effekt ^{III}	Klinischer Phänotyp			Immunologischer Phänotyp				Referenz
		Phänotyp ^{III}	Infektion ^{IV}	Folge ^V	Phänotyp ^{VI}	Lymphozyten-proliferation	NF-κ-B Signalweg	Therapie ^{VII}	
Spleiß-Stelle I B	/	ID	B	L	IgG normal, IgA↑, IgM↓, SAD	Normal (Mitogen), Beeinträchtigt (Antigen)	Beeinträchtigt	IgG	[222]
Spleiß-Stelle I B	/	ID	B	L	IgG normal, IgA normal, IgM↓, SAD	/	Beeinträchtigt	/	[222]
Spleiß-Stelle I B	/	ID	B, M	V	/	/	/	/	[222]
Spleiß-Stelle	PTP/ Restfunktion	ID	B, M, Pi	L	/	/	Beeinträchtigt	A	[223]
Spleiß-Stelle	PTP/ Restfunktion	ID	B, M	V	/	/	Beeinträchtigt	A	[223]
Spleiß-Stelle	PTP/ Restfunktion	ID	M	V	/	/	/	/	[223]
Spleiß-Stelle	PTP/ Restfunktion	ID	M	V	/	/	/	A, IgG	[223]
V26Wfs112 (X113)	FS / VSC / nicht getestet	ID	M	V	IgG↑, IgA↓, IgM↑	/	Beeinträchtigt	A, IgG	[224]
M38HfsX49	FS / VSC / Restfunktion	ID	B, M, V	V	IgG↓, IgA↓, IgM↑, SAD	Normal (Mitogen)	Beeinträchtigt	A, IgG	[117, 123, 225-227]
P42fsX75	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[108, 228]
S43CfsX76	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[108, 229]
Q45X	SC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[229]
E57K	ASA	IP	/	/	/	/	/	/	[226, 228, 229]
E57K	ASA	IP	/	/	/	/	Normal	/	[230]
E57K	ASA	EDA-ID	B	L	IgG↓, IgA↓, IgM↓, SAD	/	/	A, IgG	[231]
E57K	ASA	ID	B	L	HGG, SAD	/	Beeinträchtigt	/	[232]
R62X	SC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[108, 226, 229]
R62X	SC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228]
R62X	SC / Verlust	IP	/	/	/	/	Beeinträchtigt	/	[230]
L72fsX40	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
R73fsX40	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228]

Position (Protein)	Effekt ^{viii}	Klinischer Phänotyp			Immunologischer Phänotyp				Therapie ^{vii}	Referenz
		Phänotyp ⁱⁱⁱ	Infektion ^{iv}	Folge ^v	Phänotyp ^{vi}	Lymphozyten- proliferation	NF-κ-B Signalweg			
E74SfsX41	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
E77RfsX38	FS /VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	/	[229]
L80P	ASA (CC1)	EDA- ID	B, Pi	L	SAD	Beeinträchtigt (Mitogen, Antigen)	Beeinträchtigt	IgG		[117, 123, 178, 226]
Q86X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	/	[229]
ΔK90	TP (CC1) / Restfunktion	IP	/	/	/	/	Beeinträchtigt	/		[226, 229, 230]
Q98X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
D113N	ASA (CC1)	IP	/	/	/	/	Normal	/		[229, 230]
D113N	ASA (CC1)	ID	V, Pi	L	Normal Ig	Normal (Mitogen), Beeinträchtigt (Antigen)	Beeinträchtigt	A, IgG		[117, 233]
D113N	ASA (CC1)	EDA- ID	B	L	Normal Ig, IgE↑	Normal (Mitogen)	/	/		[231]
D113N	ASA (CC1)	ID	V, Pi	L	/	/	Beeinträchtigt	SZT		[128, 234]
D113N	ASA (CC1)	EDA- ID	B, M, V, Pi	L	IgG normal, IgA normal, IgM↑, SAD	Beeinträchtigt (Mitogen, Antigen)	/	A, IgG		[235]
R123W	ASA (CC1)	IP	/	/	/	/	Normal	/		[226, 229, 230]
Q132X	SC (CC1) / Mosaik	IP	/	L	/	/	/	/	/	[236]
Q132X	SC (CC1) / nicht getestet	EDA	/	L	/	/	/	/	/	[236]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	/	[228, 230]
133X	SC (CC1) / Mosaik	EDA	/	L	/	/	/	/	/	[237]
133X	SC (CC1) / Mosaik	EDA	/	L	/	/	/	/	/	[237]
133X	SC (CC1) / Mosaik	EDA	/	L	/	/	/	/	/	[237]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	EDA	/	L	/	/	/	/	/	[237]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[238]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[238]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[238]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[238]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[238]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[238]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[238]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[238]

Position (Protein)	Effekt ^{viii}	Klinischer Phänotyp			Immunologischer Phänotyp				Therapie ^{vii}	Referenz
		Phänotyp ⁱⁱⁱ	Infektion ^{iv}	Folge ^v	Phänotyp ^{vi}	Lymphozyten- proliferation	NF-κ-B Signalweg			
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[239]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[239]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[239]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[239]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[239]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[239]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[239]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[239]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[236]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[236]
133X	SC (CC1) / Mosaik	EDA, IP	/	L	/	/	/	/	/	[236]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	/	[240]
133X	SC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	Normal	/	/	[241]
ΔQ134-R256, ΔIV-VI	PTP (CC1) / nicht getestet	ID	/	V	/	/	/	/	/	[117, 123, 128, 242]
ΔQ134-R256, ΔIV-VI	PTP (CC1) / nicht getestet	ID	/	Ab	/	/	/	/	/	[117, 123, 128, 242]
ΔQ134-R256, ΔIV-VI	PTP (CC1) / nicht getestet	ID	/	V	/	/	/	/	/	[117, 123, 128, 242]
ΔQ134-R256, ΔIV-VI	PTP (CC1) / nicht getestet	ID	/	V	/	/	/	/	/	[117, 123, 128, 242]
ΔQ134-R256, ΔIV-VI	PTP (CC1) / nicht getestet	EDA- ID	Pi	V	IgG↓, IgM↓	/	/	/	/	[117, 123, 128, 242]
ΔQ134-R256, ΔIV-VI	PTP (CC1) / nicht getestet	ID	/	V	/	/	/	/	/	[117, 123, 128, 242]
ΔQ134-R256, ΔIV-VI	PTP (CC1) / nicht getestet	EDA- ID	B	V	IgG normal, IgA normal, IgM↑	/	/	/	/	[117, 123, 128, 242]
ΔQ134-R256, ΔIV-VI	TP (CC1) / Restfunktion	ID	/	Ab	/	/	Beeinträchtigt	/	/	[117, 123, 128, 242]
ΔQ134-R256, ΔIV-VI	PTP (CC1) / nicht getestet		B	V	IgG↓, IgA↓, IgM↓	/	/	A	/	[117, 123, 128, 242]
ΔQ134-R256, ΔIV-VI	PTP (CC1) / nicht getestet	EDA- ID	/	V	/	/	/	/	/	[117]

Position (Protein)	Effekt ^{viii}	Klinischer Phänotyp			Immunologischer Phänotyp			Therapie ^{vii}	Referenz
		Phänotyp ⁱⁱⁱ	Infektion ^{iv}	Folge ^v	Phänotyp ^{vi}	Lymphozyten- proliferation	NF-κ-B Signalweg		
ΔQ134-R256, ΔIV-VI	PTP (CC1) / nicht getestet	ID	/	V	/	/	/	/	[117]
ΔQ134-R256, ΔIV-VI	PTP (CC1) / nicht getestet	ID	/	V	/	/	/	/	[117]
ΔQ134-R256, ΔIV-VI	PTP (CC1) / nicht getestet	EDA-ID-L	B, M, Pi	V	IgM↑, SAD	/	/	SZT	[243]
ΔQ134-R256, ΔIV-VI	PTP (CC1) / nicht getestet	EDA-ID-OL	B, V	V	IgG↓, IgA normal, IgM↑, SAD	Normal (Mitogen)	Beeinträchtigt	SZT	[231]
ΔQ134-R256, ΔIV-VI	TP (CC1) / Restfunktion	IP	/	Ab	/	/	Beeinträchtigt	/	[244]
V142EfsX23	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	EDA-ID	/	L	/	/	/	A, T	[245]
V146G	ASA (CC1)	EDA-ID	B	L	IgG↓, IgA↑, IgM↓	/	Beeinträchtigt	/	[246]
V146G	ASA (CC1)	EDA-ID	B, V	L	IgG↓, IgA↑, IgM↓	/	/	SZT	[128, 234]
E152SfsX129	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[229]
L153R	ASA (CC1)	EDA-ID	B, V	L	IgG↓, IgA↑, SAD	Normal (Mitogen, Antigen), Beeinträchtigt (ConA)	Beeinträchtigt	A, C, SZT	[117, 123, 125, 128, 183, 247, 248]
Q157P	ASA (CC1)	EDA-ID-OL	/	/	/	/	/	SZT	[128]
A162P	ASA (CC1)	EDA-ID	/	/	/	/	/	SZT	[128]
A169P	ASA (CC1)	EDA-ID	B, V	L		Normal (Mitogen)	Beeinträchtigt	A, C, IgG	[122, 123, 249]
G172fsX106	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228]
R173G	ASA (CC1)	EDA-ID	B	L	Normal Ig, SAD	/	Beeinträchtigt	A, IgG	[117, 123, 250]
R173GfsX108	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
R173SfsX15	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[229]
A174fsX12	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
A174QfsX15	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	[238]
A174QfsX15	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	[238]
A174QfsX15	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	[238]
ΔA174-K224	TP (CC1) / Restfunktion	EDA-ID	B, M	V	IgG↓, IgA↑, IgM↓	Beeinträchtigt (Mitogen, Antigen)	Beeinträchtigt	A, IgG	[251]
A174QfsX15	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	EDA-ID	B, M	V	IgM↓	Beeinträchtigt (Mitogen)	/	A, IgG	[252]
R175P	ASA (CC1)	EDA-ID	B	L	IgA↑, SAD	/	/	/	[117, 123, 247, 253, 254]

Position (Protein)	Effekt ^{viii}	Klinischer Phänotyp			Immunologischer Phänotyp			Therapie ^{viii}	Referenz
		Phänotyp ⁱⁱⁱ	Infektion ^{iv}	Folge ^v	Phänotyp ^{vi}	Lymphozyten- proliferation	NF-κ-B Signalweg		
R175PfsX13	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
R175P	ASA (CC1)	EDA-ID	B, V	L	/	Normal (Mitogen)	Beeinträchtigt	IgG	[122]
R175P	ASA (CC1)	EDA-ID	B	L	/	Normal (Mitogen)	Beeinträchtigt	IgG	[122]
R182P	ASA (CC1)	EDA-ID	B	L	/	/	Beeinträchtigt	A	[122]
Q183fsX56	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228]
Q183H	ASA (CC1)	IP	/	L	/	/	/	/	[238]
L184RfsX57	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
A190fsX89	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228]
L191CfsX90	FS / VSC (CC1) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
Q205X	SC / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	[255]
Q205X	SC / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	[255]
Q205X	SC / nicht getestet	ID	B, Pi	V	/	/	/	/	[255]
Q205X	TP / Restfunktion	ID	B	L	/	/	/	SZT	[255]
G205X	SC / nicht getestet	EDA-ID	/	/	/	/	/	SZT	[128]
L213fsX64	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228]
R214fsX67	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228]
R214SfsX65	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
R214HfsX38	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	[256]
M215SfsX68	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
R217G	ASA	EDA-ID	B	L	Normal Ig	/	/	A	[117, 257]
S221X	SC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[229]
E223K	ASA	EDA-ID	B	L	IgG normal, IgA normal, IgM↓, SAD	/	Beeinträchtigt	IgG	[258]
DE223	PTP / Restfunktion	EDA-ID	B	L	IgG normal, IgA↑, IgM↓	Normal (Mitogen, Antigen)	Beeinträchtigt	/	[258]
K224fsX9	TP / Mosaik	EDA-ID-L	B, M, Pi	V	IgG↑, IgA↑, SAD	Beeinträchtigt (Mitogen)	Beeinträchtigt	A, IgG	[122, 259]
K224fsX9	PTP / Mosaik	EDA-ID	B, M	V	/	Beeinträchtigt (Mitogen)	/	A, IgG, SZT	[122]
L227P	ASA	EDA-ID	B	V	/	/	/	/	[117, 123, 254, 260]
L227P	ASA	EDA-ID	/	L	IgG↓, SAD	/	/	/	[117, 123, 247, 254, 260]

Position (Protein)	Effekt ^{vi}	Klinischer Phänotyp			Immunologischer Phänotyp			Therapie ^{vii}	Referenz
		Phänotyp ⁱⁱⁱ	Infektion ^{iv}	Folge ^v	Phänotyp ^{vi}	Lymphozyten- proliferation	NF-κ-B Signalweg		
L227P	ASA	EDA-ID	/	V	/	/	/	/	[117, 123, 254, 260]
L227P	ASA	EDA-ID	B	L	/	Normal (Mitogen)	Beeinträchtigt	A	[122]
Q236X	SC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
Q239X	SC / Verlust	IP	/	/	/	/	Beeinträchtigt	/	[229, 230]
Y241X	SC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
R254G	ASA	ID	M, V	/	/	/	/	/	[247]
R254G	ASA	ID	B, M, V	V	/	/	Beeinträchtigt	/	[261]
R254Q	ASA	ID	B, M	L	IgG↓, SAD	/	/	A, IgG, SZT	[128, 262]
R256X	SC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[229]
K264fsX284	FS / VSC (CC2) / Restfunktion	EDA-ID	B, V, Pi	L	IgG↓, IgM↑	Beeinträchtigt (CD3), Normal (CD3/CD28)	Beeinträchtigt	IgG	[117, 229, 263]
Q265TfsX19	FS / VSC (CC2) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[229, 263]
ΔE271-A276	TP (CC2) / Restfunktion	EDA-ID	B	L	SAD	/	Beeinträchtigt	/	[117, 123, 178]
A288G	ASA (CC2)	EDA-ID	B	L	IgG↓	/	/	/	[117, 123, 247, 254]
Q290X	SC (CC2) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
V298fsX2	FS / VSC (CC2) / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228]
P299RfsX3	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
Q304-A305insDLP	PVP	EDA-ID	/	/	/	/	/	SZT	[128]
D306N	ASA	EDA-ID	/	V	IgA↑, IgM normal	Beeinträchtigt (CD3, CD3/CD28)	Beeinträchtigt	A, IgG, SZT	[128, 264]
Y308PfsX3	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	[265]
D311N	ASA	EDA-ID	B, M	V	IgG↓, SAD	/	/	/	[117, 123, 247, 254]
D311G	ASA	EDA-ID	B, M	L	Normal Ig	Normal (Mitogen, Antigen)	Beeinträchtigt	A	[123, 266]
D311E	ASA	EDA-ID	B, M, V	L	Normal Ig, SAD	Normal (Mitogen)	Beeinträchtigt	A, IgG, SZT	[122, 128, 267]
D311N	ASA	EDA-ID	B, M, V	V	IgG↓, IgA↑	/	Normal	IgG	[261]
F312L	ASA	EDA-ID	/	/	/	/	/	SZT	[128]
Q313X	SC / Mosaik	EDA	/	L	/	/	/	/	[268]
E315GfsX393	FS / VSC / Verlust	IP	/	/	/	/	Beeinträchtigt	/	[229, 230]

Position (Protein)	Effekt ^{viii}	Klinischer Phänotyp			Immunologischer Phänotyp				Referenz
		Phänotyp ⁱⁱⁱ	Infektion ^{iv}	Folge ^v	Phänotyp ^v	Lymphozyten- proliferation	NF-κ-B Signalweg	Therapie ^{vii}	
E315A	ASA	ID	B, M	/	IgA↑, SAD	/	/	/	[247]
E315A	ASA	EDA-ID	B, M	V	Normal Ig, IgA↑	Normal (Mitogen, Antigen)	Beeinträchtigt	A	[179, 261, 269]
E315A	ASA	ID	/	V	/	/	/	/	[117]
E315A	ASA	ID	/	L	/	/	/	/	[117]
E315A	ASA	ID	/	V	/	/	/	/	[117]
E315A	ASA	ID	B, M	V	IgA↑	/	Normal	IgG	[261]
E315A	ASA	EDA-ID	B, M	V	/	/	/	A, SZT	[262]
R319Q	ASA (LZ)	ID	B, M	L	IgG↑, IgA normal, IgM↑, IgD↑, IgE normal	Normal (Mitogen, Antigen)	Beeinträchtigt	A	[117, 179, 269]
R319Q	ASA (LZ)	EDA-ID	B, M	L	Normal Ig	Normal (Mitogen, Antigen)	Beeinträchtigt	A	[117, 179, 269]
A323P	ASA (LZ)	IP	/	L	/	/	/	/	[229, 270]
ΔE331-L333	PTP (LZ) / nicht getestet	ID	B, M, V	/	IgA↑	/	/	/	[247]
ΔE331-L333	PTP (LZ) / Restfunktion	ID	B, M	V	IgA↑	/	Normal	/	[261]
Q332X	SC (LZ) / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	[239]
Q348X	SC / Mosaik	EDA-ID	M	L	/	Normal (Mitogen)	/	A, IgG	[122]
Q348X	SC / Restfunktion	EDA-ID	B, M, V, Pi	L	IgG normal, IgA normal, IgM↑, SAD	Beeinträchtigt (Mitogen, Antigen)	/	A, IgG	[235]
Q348X	SC / nicht getestet	EDA-ID	/	/	/	/	/	SZT	[128]
R352SfsX22 ΔIX	TP / Restfunktion	EDA-ID	B	V	/	/	/	A, IgG	[185]
D353fsX373 ΔIX	TP / Mosaik	ID	B, M	V	IgG2↓, IgG3↓, IgA↑, SAD	Normal (Mitogen)	Beeinträchtigt	/	[117, 123, 183, 184]
H360Mfs X449	PVP	IP	/	/	/	/	Beeinträchtigt	/	[229, 230]
P370fsX23	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[108]
P370fsX23	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228]
A371PfsX80	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[229]
A371RfsX24	FS / VSC / nicht getestet	EDA-ID, IP	/	/	/	/	/	/	[108, 123, 229]
A371CfsX24	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	L	/	/	/	/	[238]
P372PfsX450	PVP	IP	/	/	/	/	/	/	[230]
A373CfsX22	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[229]
S377PfsX16	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[229]
L379RfsX15	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[229]

Position (Protein)	Effekt ^{III}	Klinischer Phänotyp			Immunologischer Phänotyp			Therapie ^{VII}	Referenz
		Phänotyp ^{III}	Infektion ^{IV}	Folge ^V	Phänotyp ^V	Lymphozyten- proliferation	NF-κ-B Signalweg		
Q384X	SC / Restfunktion	IP	/	/	/	/	Beeinträchtigt	/	[229, 230]
S387fsX58	PVP	IP	/	Ab	/	/	/	/	[228]
S387fsX58	PVP	IP	/	/	/	/	/	/	[228]
P388HfsX59	PVP	IP	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
P389fsX60	PVP	IP	/	Ab	/	/	/	/	[228]
P389fsX4	FS / VSC / Restfunktion	IP	/	/	/	/	/	/	[228]
P389fsX60	PVP	IP	/	/	/	/	/	/	[228]
P389fsX4	FS / VSC / Restfunktion	IP	/	/	/	/	/	/	[228]
P389fsX4	FS / VSC / Restfunktion	EDA-ID, IP	B	L	IgG↓	Beeinträchtigt	/	/	[228]
P389fsX4	FS / VSC / nicht getestet	EDA-ID	B	V	IgD↑, IgE↑	/	/	/	[121]
E390fsX394 (E390fsX4)	FS / VSC / nicht getestet	EDA-ID-O	B, M	V	IgG↓, IgA↓, IgM↑, SAD	Normal (Mitogen)	/	IgG	[118, 183, 247]
E390fsX394 (E390fsX4)	FS / VSC / nicht getestet	EDA-ID-O	B, M, Pi	V	IgG↓, IgA↓, IgM↑, SAD	/	/	/	[118, 183, 247]
E390fsX394 (E390fsX4)	FS / VSC / nicht getestet	EDA-ID	B, M, V	V	/	/	/	/	[117, 254, 271]
E390fsX394 (E390fsX4)	FS / VSC / nicht getestet	EDA-ID-O	B, M, V, Pi	L	/	/	/	A, IgG	[117, 128, 182]
E390fsX394 (E390fsX4)	FS / VSC / nicht getestet	ID	V	V	/	/	/	/	[117, 182]
E390fsX394 (E390fsX4)	FS / VSC / nicht getestet	EDA-ID	B, Pi	L	HGG	Normal (Mitogen)	Beeinträchtigt	IgG, SZT	[122, 128, 272]
E390fsX394 (E390fsX4)	FS / VSC / nicht getestet	EDA-ID	/	L	/	/	/	IgG	[273]
E390fsX394 (E390fsX4)	FS / VSC / nicht getestet	EDA-ID	/	L	IgG↓, IgA↓, IgM↓	/	/	SZT	[117, 274]
E390fsX394 (E390fsX4)	FS / VSC / nicht getestet	EDA-ID	/	/	HGG	/	/	SZT	[243]
E390fsX394 (E390fsX4)	FS / VSC / nicht getestet	EDA-ID	B, Pi	L	IgG↓	/	Beeinträchtigt	A, IgG, SZT	[262]
E390fsX394 (E390fsX4)	FS / VSC / nicht getestet	ID	/	/	/	/	/	SZT	[128]
E390fsX394 (E390fsX4)	FS / VSC / nicht getestet	EDA-ID	/	/	/	/	/	SZT	[128]
E390fsX394 (E390fsX4)	FS / VSC / Verlust	EDA-ID- OL	/	/	/	/	/	SZT	[128, 248]
E390fsX394	TP / nicht getestet	EDA-ID	M	L	/	/	Beeinträchtigt	/	[275]
E391X	TP / nicht getestet	EDA-ID	B	L	IgG normal, IgA↑, IgM normal, IgE normal, SAD	Beeinträchtigt	/	IgG	[117, 118]
E391X	TP / nicht getestet	EDA-ID	B	L	IgG↑, IgA↑, IgM normal, IgE↓	/	/	IgG	[117, 118]
E391X	SC / nicht getestet	EDA-ID	/	L	/	/	/	/	[117, 118]

Position (Protein)	Effekt ^{vi}	Klinischer Phänotyp			Immunologischer Phänotyp			Therapie ^{vii}	Referenz
		Phänotyp ⁱⁱⁱ	Infektion ^{iv}	Folge ^v	Phänotyp ^{vi}	Lymphozyten- proliferation	NF-κ-B Signalweg		
E391X	SC / nicht getestet	EDA- ID	B, Pi	L	IgG normal, SAD	Normal (Mitogen)	/	C	[118, 276]
E391X	SC / nicht getestet	EDA- ID	B, Pa	L	IgG normal, SAD	Normal (Mitogen)	/	/	[118, 276]
E391X	SC / nicht getestet	EDA- ID	B	L	IgG↓, SAD	Beeinträchtigt (Mitogen)	/	C	[118, 276]
E391X	SC / nicht getestet	EDA- ID	B	L	IgG normal	Beeinträchtigt (Mitogen)	/	/	[276]
E391X	SC / nicht getestet	EDA- ID	B, Pi	L	IgG↓	Beeinträchtigt (Mitogen)	/	/	[276]
E391X	SC / nicht getestet	EDA- ID	B, Pi	L	IgG normal	Normal (Mitogen)	/	/	[276]
E391X	FS / VSC / nicht getestet	EDA- ID	B	L	IgG normal	Normal (Mitogen)	/	/	[276]
P393fsX4	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	V	/	/	/	/	[228, 277]
P393fsX4	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228]
P393fsX4	FS / VSC / Restfunktion	ID	/	V	/	/	Beeinträchtigt	/	[117, 278]
P393fsX4	FS / VSC / Restfunktion	ID	/	V	/	/	Beeinträchtigt	/	[117, 278]
fs393X	FS / VSC / nicht getestet	EDA- ID	B, V	L	IgG↓, IgA↓, IgM normal	Normal (Mitogen, Antigen)	/	/	[117, 257]
D394RfsX5	FS / VSC / nicht getestet	IP	/	/	/	/	/	/	[228, 229]
F395LfsX11	FS / VSC / nicht getestet	EDA- ID, IP	/	/	/	/	/	/	[123, 229]
F395LfsX10	FS / VSC / nicht getestet	EDA- ID- OL	B, V	L	IgG↓, IgM↑	Normal (Mitogen)	/	A, IgG, SZT	[128, 279]
P398S	ASA (ZF)	EDA- ID	M	L	/	/	Beeinträchtigt	/	[275]
Q401X	SC (ZF) / nicht getestet	/	/	/	/	/	/	/	[123, 226]
Q403X	SC (ZF) / Restfunktion	EDA- ID	B, M, V	L	IgG↓, IgA↓, IgM↓, SAD	Beeinträchtigt	Beeinträchtigt	IgG	[125, 183, 247]
Q403X	SC (ZF) / Restfunktion	EDA- ID	B, M	L	IgG↓, IgA↑	/	Beeinträchtigt	IgG	[261]
D406EfsX13	FS / VSC (ZF) / nicht getestet	EDA- ID	B	V	/	/	/	/	[117, 254]
D406EfsX13	FS / VSC (ZF) / nicht getestet	EDA- ID	B	V	/	/	/	/	[117, 254]
D406V	ASA (ZF)	EDA- ID	B	L	IgG↓, IgA↓, IgM↓, SAD	Normal	Beeinträchtigt	IgG	[124, 181, 247]
D406V	ASA (ZF)	ID	/	L	/	/	Beeinträchtigt	/	[280]
M407V	ASA (ZF)	IP	/	/	/	/	/	/	[108]
M407V	ASA (ZF)	IP	/	/	/	/	/	/	[228]
M407V	ASA (ZF)	ID	B	L	IgG↓, IgE↑, SAD	/	/	C, SZT	[262]
I412fsX418	FS / VSC (ZF) / nicht getestet	EDA- ID	B, M	/	IgG↓, SAD	/	Beeinträchtigt	/	[117, 181, 247]
H413P	ASA (ZF)	EDA- ID	/	/	/	/	/	SZT	[128]
H413SfsX6	FS / VSC (ZF) / nicht getestet	EDA- ID	/	/	/	/	/	SZT	[128]

Position (Protein)	Effekt ^{III}	Klinischer Phänotyp			Immunologischer Phänotyp			Therapie ^{VII}	Referenz
		Phänotyp ^{III}	Infektion ^{IV}	Folge ^V	Phänotyp ^V	Lymphozyten- proliferation	NF-κ-B Signalweg		
H413R	ASA (ZF)	EDA-ID-OL	B, V, Pi	V	IgG↓, IgA↓, IgM↓	Normal (Mitogen)	Beeinträchtigt	A, IgG, SZT	[281]
M415IfsX5	FS / VSC (ZF) / nicht getestet	EDA-ID	/	/	/	/	/	/	[123, 128, 229]
C417R	ASA (ZF)	EDA-ID	B	V	IgG↓, IgA↓, IgM↑	/	/	IgG	[118]
C417R	ASA (ZF)	EDA-ID	B	L	IgG↓, IgM↑	/	/	IgG	[118]
C417F	ASA (ZF)	EDA-ID	B, V	L	IgG↓, IgG2↓, IgA↑, IgM↑, SAD	/	/	IgG	[118, 247]
C417R	ASA (ZF)	EDA-ID	B	V	/	/	/	/	[117, 254]
C417R	ASA (ZF)	EDA-ID	B	L	/	/	/	/	[254]
C417F	ASA (ZF)	EDA-ID	B	L	/	/	/	/	[254]
C417R	ASA (ZF)	EDA-ID	B	L	IgG↓, IgA↓, IgM↓	Normal	Normal	IgG	[124]
C417R	ASA (ZF)	ID	B	V	/	/	/	/	[117, 124]
C417R	ASA (ZF)	EDA-ID	B, M, V	L	IgG↓, SAD	Normal (Mitogen), Beeinträchtigt (Antigen)	/	IgG	[125, 183]
C417Y	ASA (ZF)	EDA-ID	B	L	IgG↓, IgA↑, SAD	Normal (Mitogen)	Beeinträchtigt	/	[183, 247]
C417R	ASA (ZF)	EDA-ID	B, M, V	V	IgG↓, IgA↑	/	Beeinträchtigt	IgG	[261]
X420W (X420fsX27)	PVP (ZF)	IP	/	/	/	/	/	/	[108]
X420W (X420fsX27)	PVP (ZF)	IP	/	/	/	/	/	/	[228]
X420W (X420fsX27)	PVP (ZF)	EDA-ID-OL	B, M	V	/	/	/	/	[108, 117, 254]
X420W (X420fsX27)	PVP (ZF)	EDA-ID-OL	B, M, Pi	V	IgG↓, IgA normal, IgM normal, SAD	/	/	/	[117, 254]
X420W (X420fsX27)	PVP (ZF)	EDA-ID-OL	B, M, V, Pi	V	IgG↓, SAD	Normal (Antigen)	Beeinträchtigt	SZT	[127]
Spleißstelle IV	/	IP	/	L	/	/	/	/	[282]
Spleißstelle IV	/	ID	B	V	/	/	/	A	[282]
Spleißstelle IV	/	ID	B, V, Pi	V	IgG normal, IgA↓, IgM normal, SAD	Normal (Mitogen)	/	A, IgG	[282]
Spleißstelle IV	/	ID	B, V, Pi	V	IgG↓, IgA↓, IgM↓	/	/	A, IgG	[282]
Spleißstelle 769-1 G>C	/	EDA-ID	B	L	Normal Ig, SAD	Normal (Mitogen), Beeinträchtigt (Antigen)	/	/	[283]

^I Funktion des Proteins: Restfunktion (eingeschränkte Funktion im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle), Verlust (kompletter Funktionsverlust im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle) oder nicht getestet; Mosaik (Vorkommen in verschiedenen Zellpopulationen)

^{II} Effekt auf Proteinstruktur: ASA, Aminosäureaustausch; FS, *Frameshift* (Leserasterverschiebung); PTP, Prognose für trunkiertes Protein (kein struktureller Nachweis mittels Westernblot-Analyse); PVP, Prognose für verlängertes Protein (kein struktureller Nachweis mittels Westernblot-Analyse); SC, Stopcodon; TP, Trunkiertes Protein (struktureller Nachweis mittels Westernblot-Analyse); VSC, Vorläufiges Stopcodon

^{III} Klinischer Phänotyp: EDA, Ektodermale Dysplasie mit Anhidrose; ID, Immundefekt; IP, Incontinentia Pigmenti; L, Lymphödem; O, Osteopetrose

^{IV} Infektion: B, Bakteriell; M, Mykobakteriell; Pi, Pilz; Pa, Parasit; V, Viral

^V Folge: Ab, Abort; L, Lebend; V, Verstorben

^{VI} Immunologischer Phänotyp: ↑, Erhöht; ↓, Vermindert; HGG, Hypogammaglobulinämie; SAD, Spezifischer Antikörperdefekt

^{VII} Therapie: A, Antibiotika; C, Corticosteroide; IgG, Immunglobulin-Substitution; T, Transplantation (Leber); SZT, Stammzelltransplantation

12.2. Anti-IL-6-AAk

12.2.1. Patientenkohorte PK1

Die Patientenkohorte umfasst 349 Patienten, die mindestens einmal an einer schweren bakteriellen Infektion erkrankten bzw. deren klinischer Phänotyp eine bakterielle Infektion trotz fehlendem Erregernachweis nahelegte. PK1 wurde im Vorfeld auf ID mit Auswirkung auf den TLR- bzw. IL-1R-Signalweg untersucht und beinhaltet Patienten mit IRAK4- (n = 3), MECP2- (n = 4), MyD88- (n = 2) und NEMO-Defekt (n = 3). Die Patienten litten an unterschiedlichen Infektionen, die sich in Form verschiedener klinischer Phänotypen wie Pneumonie, Sepsis, Meningitis bis hin zur Arthritis und Osteomyelitis widerspiegeln. Auslöser waren vermehrt Gram-positive Bakterien (*S. pneumoniae* n = 80, *S. aureus* n = 59, *Streptococcus spp.* n = 15, *S. pyogenes* n = 13, *Staphylococcus spp.* n = 11, *S. agalactiae* n = 10). Gram-negative Bakterienstämme (*H. influenzae* n = 27, *Pseudomonas spp.* n = 21, *E. coli* n = 16) wurden ebenfalls isoliert.

12.2.2. Patient P1

P1 wurde nach STIKO-Richtlinien geimpft. Die Impfungen beinhalteten den Einsatz des Pneumokokken-Polysaccharid-spezifischen Impfstoffs Prevenar, welcher die Pneumokokken Serotypen 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F sowie das Diphtherie-Toxoid-Protein CRM197 abdeckt. Aufgrund des fehlenden IL-6- und CrP-Nachweises wurde zu Beginn ein PID in den TLR- und IL-1R-Signalwegen vermutet, jedoch durch den unauffälligen immunologischen Phänotyp ausgeschlossen (Tabelle 41). Aufgrund des verminderten Tetanus-Toxoid-Titers und der niedrigen Immunglobulin-Spiegel wurde eine Verlaufskontrolle durchgeführt (Tetanus-Toxoid 1,122 IU/ml, IgG 8,3 g/l, IgG₁ 3,9 g/l, IgG₂ 1,3 g/l, IgG₃ 0,3 g/l, IgG₄ < 0,04 g/l, IgA 0,96 g/l). P1 ist derzeit 11 ¹⁰/₁₂ Jahre alt und zeigt einen guten allgemeinen Zustand.

Seine prophylaktische antibiotische Therapie wurde im Alter von 5 ½ Jahren eingestellt. P1 litt seitdem an keiner schweren bakteriellen Infektion.

Tabelle 41. Immunologische Parameter von P1

	P1	Referenzbereich
Inflammatorische Parameter		
CrP [mg/l]	7,6	< 5
PCT [µg/l]	2,63	< 0,1
IL-6 [pg/ml]	< 0,5	< 0,5
Temperatur (°C)	40	< 38
Leukozyten [G/l]	10,4	4,8-13,1
Thrombozyten [G/l]	68 (Minimum 24)	220-490
Differentialblutbild [Zellen/µl]		
Neutrophile Granulozyten	4212	1500-8500
Eosinophile Granulozyten	312	0-300
Basophile Granulozyten	78	< 120
Monozyten	624	300-1200
Lymphozyten	2574	1100-5900
Lymphozytenpopulation [Zellen/µl]		
CD3 ⁺ T-Zellen	2062	700-4200
CD4 ⁺ T-Zellen	1236	300-2000
CD8 ⁺ T-Zellen	762	300-1800
Ratio CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,62	0,9-2,6
CD19 ⁺ B-Zellen	353	200-1600
CD16 ⁺ CD56 ⁺ NK-Zellen	160	90-900
Immunglobulin [g/l]		
IgG	4,94	5,9-14,3
IgG ₁	4,63	3,8-11,7
IgG ₂	0,432	0,73-2,9
IgG ₃	0,129	0,13-0,75
IgG ₄	0,08	0,013-1,57
IgA	0,7	0,38-2,22
IgE [kU/l]	4	< 190
Spezifische Antikörper		
PCP-IgG [mg/l]	16,3	< 3,3
Serotyp 19F [µg/ml]	2,56 (Anstieg auf 15,43)	0,35
Tetanus-Toxoid [IU/ml]	0,10	≥ 0,5
Diphtherie-Toxoid [IU/ml]	0,008	≥ 0,1
<i>H. influenzae</i> Typ B [mg/l]	0,78	≥ 0,15
Komplementdiagnostik		
Klassischer Weg CH50 [%]	92	65-135
Alternativer Weg APH50 [%]	82	60-140
C3d [mU/l]	13	< 40
sC5b-9 [ng/ml]	99	58-239
MBL [ng/ml]	975	> 50
Properdin [µg/ml]	14,1	7-22

CD, *Cluster of differentiation*; CrP, C-reaktives Protein; Ig, Immunglobulin; MBL, Mannose-bindendes Lectin; PCP, *Pneumococcal capsular polysaccharide*; PCT, Procalcitonin

12.2.3. Patient P2

P2 entwickelte im Alter von 11 Monaten eine bakterielle Infektion (*S. aureus*), die zu Hautläsionen und subkutanen Abszessen führte. Trotz der Infektion präsentierte P2 kein erhöhtes CrP (< 5 mg/l). Er hatte Fieber (39 °C) und besaß einen erhöhten Spiegel an PCT (2 ng/ml) sowie an neutrophilen Granulozyten (11,3 g/l) (Tabelle 42). Im Alter von 2 5/12 Jahren erkrankte P2 erneut an einer *S. aureus* Infektion (Hautläsionen und Follikulitis). Er erhielt jeweils eine antibiotische Therapie [114].

P2 ist derzeitig 17 ⁶/₁₂ Jahre alt und weist einen guten allgemeinen Zustand auf. Seit 2008 erhält er keine prophylaktische Antibiotikatherapie mehr und litt an keinen weiteren Infektionen (Informationen und Material wurden zur Verfügung gestellt vom *Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases*, INSERM U1163, Paris, Frankreich / Universität Paris Descartes, *Imagine Institute*, Paris, Frankreich, Kontakt Dr. Anne Puel).

Tabelle 42. Immunologische Parameter von P2

	P2 [114]	Referenzbereich
Inflammatorische Parameter		
CrP [mg/l]	< 5	< 5
PCT [µg/l]	2,0	< 0,5
Temperatur (°C)	39	< 38
Differentialblutbild [Zellen/µl]		
Neutrophile Granulozyten	11300 (später 850)	1300-8700
Lymphozyten	2550	2700-12600
Immunglobulin [mg/ml]		
IgG	7,17	3,35-6,23
IgA	0,26	0,27-1,06
IgM	1,07	0,48-1,43
Spezifische Antikörper		
Tetanus-Toxoid [IU/ml]	> 5	
<i>H. influenzae</i> Typ B [mg/l]	positiv	
Polio-Virus	> 640	
VZV (IgG, IgM)	positiv	
<i>S. pneumoniae</i> [µg/ml]	0,7	

CrP, C-reaktives Protein; Ig, Immunglobulin; PCT, Procalcitonin; SAA, Serumamyloid A; VZV; Varizella-Zoster-Virus

12.2.4. Patientin P3

Am Alter von 1 ¹¹/₁₂ Jahren litt P3 (Eltern nicht-konsanguin) an einem submandibulären Abszess (verzögert durchgebrochener Backenzahn). Es erfolgte eine Zahnextraktion sowie eine antibiotische Behandlung. P3 besaß weder Fieber (37,8 °C) noch erhöhtes CrP (< 0,3 mg/l), zeigte jedoch eine Schwellung der Lymphnoten. Sie erhielt nach ihrer Entlassung eine antibiotische Prophylaxe. Vier Monate später entwickelte sie einen Fieberkrampf. P3 hatte im Alter von 2 ⁵/₁₂ Jahren erneut Fieber (> 40 °C) und klagte zusätzlich über starke Gelenkschmerzen. Sie litt an einem geschwollenen linken Zeigefingergrundgelenk, einem Erguss am rechten Ellenbogengelenk, einem Erguss am rechten Hüftgelenk (Coxitis) sowie einer vergrößerten Milz. CrP (8,6 mg/l), PCT (2,5 mg/ml), SAA, 59 mg/l und Ferritin (828 ng/ml) waren deutlich erhöht während die Leukozyten (4,3 G/l) und Thrombozyten (28 G/l) stark vermindert waren (Tabelle 43). Die isolierte Blutkultur war *S. pyogenes* positiv. Das Gelenkpunktat präsentierte sich trüb mit einer Zellzahl von 78,5 Zellen/µl (Granulozyten 80 %, Lymphozyten 7 %, Monozyten / Makrophagen 13 %). Das Liquorpunktat war klar, besaß jedoch eine erhöhte Zellzahl von 115 Zellen/µl (segmentkernige Zellen 38 %, Lymphozyten 48 %, Monozyten / Makrophagen 14 %). Initial erfolgte eine antibiotische Behandlung. Die Patientin ist zurzeit 3 ¹¹/₁₂ Jahre alt und in einem guten allgemeinen Zustand.

Eine prophylaktische Antibiotikatherapie wurde unter Berücksichtigung einer engmaschigen Überwachung nicht weiter vorgenommen.

Tabelle 43. Immunologische Parameter von P3

	P3	Referenzbereich
Inflammatorische Parameter		
CrP [mg/l]	0,3 (max. 8,6)	< 0,5
PCT [µg/l]	2,5	< 0,5
Ferritin [ng/ml]	828	6-67
SAA [mg/l]	59	< 10
Temperatur (°C)	> 40	< 38
Leukozyten [G/l]	4,3	6-17
Thrombozyten [G/l]	28	229-553
Differentialblutbild [Zellen/µl]		
Neutrophile Granulozyten	1100	1500-8500
Eosinophile Granulozyten	20	0-300
Basophile Granulozyten	30	0-100
Monozyten	400	< 800
Lymphozyten	2100	2000-8000
Lymphozytenpopulation [Zellen/µl]		
CD3 ⁺ T-Zellen	1455	1400-3700
CD4 ⁺ T-Zellen	717	700-2200
CD8 ⁺ T-Zellen	443	490-1300
Ratio CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,6	1,1-3,3
CD19 ⁺ B-Zellen	443	390-1400
CD16 ⁺ CD56 ⁺ NK-Zellen	169	100-600
Immunglobulin [g/l]		
IgG	9,1	4,5-9,2
IgA	0,44	0,20-1,00
IgM	1,83	0,19-1,46
Spezifische Antikörper		
PCP-IgG [mg/l]	12,2	1,4-110,4
PCP-IgG ₂ [mg/l]	19,5	1,2-142,8
Tetanus-Toxoid IgG [IU/ml]	4,6	< 0,5
Komplementdiagnostik		
Klassischer Weg CH50 [%]	81	65-135
Alternativer Weg APH50 [%]	102	60-140
C3d [mU/l]	20	< 40
sC5b-9 [ng/ml]	142	58-239
C3 [mg/ml]	0,78	0,89-1,87
C4 [mg/ml]	0,17	0,165-0,38
C1Q [mg/dl]	27	5-25

CD, Cluster of differentiation; CrP, C-reaktives Protein; Ig, Immunglobulin; PCP, *Pneumococcal capsular polysaccharide*; PCT, Procalcitonin; SAA, Serumamyloid A

12.2.5. Patientenkohorte PK2

Die Patientenkohorte beinhaltete Patienten mit Autoimmunerkrankungen (n = 564; NIH / NIAID, USA) von denen 200 Patienten an SLE, 151 Patienten am Sjögren-Syndrom und 100 Patienten an idiopathischer Arthritis litten. 36 Patienten erkrankten an einem Thymom. 25 Patienten litten an einem APECED-Syndrom, zwei Patienten wiederum an einer nicht-klassifizierten Vaskulitis. Ein Patient erkrankte an Morbus Crohn, ein anderer an Sarkoidose. Sieben Patienten besaßen eine nicht-klassifizierte Autoimmunerkrankung. 44 Patienten aus der Kohorte besaßen außerdem Ak gegen Zytokine: anti-IFN- γ -AAk (n = 21), anti-GM-CSF-AAk (n = 20), anti-IL-12-AAk (n = 2), anti-IFN- α /anti-IFN- ω /IL-17F/IL-22-AAk (n = 1) [284].

12.2.6. Patient P4

P4 war zum Zeitpunkt der Blutabnahme 50 Jahre alt und leidet aufgrund einer homozygoten *AIRE*-Mutation (c. 967_979del13, p. L323SfsX51) seit seinem dritten Lebensjahr am APECED-Syndrom. Zusätzlich entwickelte er einen Sjögren-Syndrom-ähnlichen Phänotyp, eine intestinale Dysfunktion sowie eine autoimmune Pneumonitis, Gastritis und Hepatitis. Er wurde im NIH zur Abklärung einer *M. avium complex* Infektion vorstellig, die zu einer anhaltenden Bronchiektasie geführt hat. Des Weiteren leidet er an einer Unterfunktion der Nebenschilddrüsen (Hypoparathyreoidismus), einer Nebenniereninsuffizienz, einer Zahnschmelzhypoplasie, sowie einem B12-Mangel. Er weist unter anderem noch Bluthochdruck, Vitiligo sowie Hypogonadismus auf [285].

12.2.7. Patientin P5

P5 war zum Zeitpunkt der Blutabnahme 53 Jahre alt und präsentierte sich im NIH zur Abklärung eines metastasierenden Thymoms (Typ B2). Es folgte eine Thymektomie sowie eine Thyreoidektomie aufgrund eines papillären Karzinoms. Sie leidet seit ihrem 52. Lebensjahr an der Nervenkrankheit Myasthenia gravis. Nach zwei krankheitsfreien Jahren wurden pleurale maligne Knötchen entdeckt und mittels Pleurektomie sowie Tumorresektion entfernt. Weitere zwei Jahre später verschlechterte sich ihr Zustand. Eine Biopsie des rechten zervikalen Lymphknotens zeigte erneut ein Thymom. Es wurde eine Halsdissektion durchgeführt und eine 4-Zyklen-Chemotherapie mit Carboplatin und Etoposid eingeleitet. Aufgrund des Voranschreitens der Erkrankung wurde die Therapie mit Gemcitabin fortgeführt, jedoch kam es zu Komplikationen in Form einer autoimmunen Hepatitis.

12.2.8. Patientenkohorte PK3

Die Patientenkohorte beinhaltete 366 Patienten (zur Verfügung gestellt vom *Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases*, INSERM U1163, Paris, Frankreich / Universität Paris Descartes, *Imagine Institute*, Paris, Frankreich; Kontakt Prof. Dr. Jean-Laurent Casanova und Dr. Jacinta Bustamante), die schon einmal an einer mykobakteriellen Infektion litten. PK2 umfasste sowohl Patienten mit einem IFN- γ -R1- (n = 17), IFN- γ -R2- (n = 8), IL-12R β 1- (n = 28), IL-12R β 2- (n = 1), IL-12p40- (n = 9), CYBA- (n = 3), CYBB- (n = 3), RORC- (n = 3), GATA2- (n = 5), HLA-DR- (n = 2), IL-17R α - (n = 1), IL-23R- (n = 1), ISG15- (n = 1), ITK- (n = 1), STAT1- (n = 4), IRF8- (n = 3), PKCD- (n = 1), SPPL2A- (n = 2) als auch einem TYK2-Defekt (n = 5). Das infektiologische Spektrum reichte von Bacilli Calmette Guerin- (n = 238), über atypischen mykobakterielle (n = 104), MTB- (n = 8) bis hin zu bakteriellen Infektionen (n = 26). Ein Patient litt unter einer viralen ein anderer unter einer Pilzinfektion.

12.2.9. Kontrollkohorte KK1-3

Die Kontrollkohorten beinhalteten Individuen, die keinen infektiologischen Phänotyp aufwiesen. KK1 bestand aus 405 Individuen, deren Impftiterstatus überprüft wurde. KK2 bestand aus 455 Individuen, die einer Studie bzgl. jugendlichem Übergewicht (Kriterium > 2 BMI SDS) angehörten. KK3 enthielt 128 Individuen mit Hypothyreose (Kriterium Thyreoidea-stimulierendes Hormon, TSH, Referenzwert 15 mU/l).

12.2.10. MN1 / N1

Aufgrund eines vorzeitigen Blasensprungs der Mutter (MN1) wurde bei dem neugeborenen Jungen (N1) eine routinemäßige IL-6-Bestimmung durchgeführt. Die Konzentration lag bei 2921 pg/ml. Das CrP und die Leukozyten lagen im Normbereich. Trotz fehlender klinischer Zeichen, die auf eine Infektion hindeuteten, und einem negativen Ergebnis innerhalb der Blutkultur erhielt N1 eine Antibiotikatherapie. Im Alter von vier Wochen und in Kombination mit einer vorliegenden Rotavirus-Infektion präsentierte N1 erneut erhöhte IL-6-Konzentrationen (2523 pg/ml). Das CrP und die Leukozyten lagen erneut im Normbereich. Es folgte eine 3-wöchige antibiotische Behandlung. MN1 zeigte während des ganzen Zeitraums keine Anzeichen einer bakteriellen Infektion und beschrieb rückblickend auf ihre Krankheitsgeschichte keine schweren Infektionen.

12.2.11. MN2 / N2

In Folge einer postnatalen Routineuntersuchung wurde ein erhöhter IL-6-Wert (361 pg/ml) bei dem neugeborenen Mädchen (N2) bestimmt. N2 zeigte keine Anzeichen einer Infektion (Temperatur, CrP und Leukozytenzahl waren normal). Sie erhielt eine prophylaktische Antibiotikatherapie. Durch eine Rotavirus-Infektion entwickelte N2 erneut erhöhte IL-6-Konzentrationen (593 pg/ml). Die Mutter (MN2) zeigte keine Anzeichen einer bakteriellen Infektion.

12.2.12. MN3 / N3

Aufgrund eines vorzeitigen Blasensprungs der Mutter (MN3) wurde bei dem neugeborenen Jungen (N3) eine IL-6-Bestimmung durchgeführt. Die Konzentration lag bei 983 pg/ml. N3 zeigte keine Anzeichen einer Infektion (Temperatur, CrP, PCT und Leukozytenzahl waren normal), erhielt dennoch eine antibiotische Therapie. MN3 war die ganze Zeit gesund und verneinte schwere bakterielle Infektionen in der Vergangenheit.

13. Danksagung

Auf diesem Weg möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Horst von Bernuth für die Bereitstellung dieses spannenden Promotionsthemas und die einzigartige Betreuung bedanken. Er stand mir bei allen Fragen und Problemen zur Seite. Ohne seine tatkräftige Unterstützung hätte ich dieses Projekt nie verwirklichen können.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Volk sowie Herrn Prof. Dr. Dirk Brockmann bedanken, die sich bereit erklärt haben, als Gutachter für meine Arbeit zur Verfügung zu stehen.

Ein besonders herzliches Dankeschön möchte ich an das großartige Laborteam der Kinderklinik, das mich so herzlich in seine Runde aufgenommen hat, richten. Jeder einzelne von euch stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite, wenn ich nicht weiterwusste. Besonders hervorheben möchte ich hier meine drei Musketiere Christine Seib, Gabriele Schulz und Alexander Rohrbach. Ihr habt jeden Tag zu etwas besonderem gemacht. *Einer für alle und alle für einen* war mit euch nicht nur eine schöne Zeile, sondern eine Tatsache und ein ganz großes Geschenk.

Ein weiteres Dankeschön geht natürlich an das umwerfende Laborteam des Fachbereichs für Immunologie im Labor Berlin. Dieses Projekt hätte ohne die tolle Zusammenarbeit nicht realisiert werden können. Ein besonderes Dankeschön gilt hierbei Dr. Uwe Kölsch. Ohne sein Engagement und seine beispiellose Hilfsbereitschaft wäre ich verloren gewesen.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. Volk und Frau Prof. Dr. Sawitzki am Institut für Medizinische Immunologie für ihre Unterstützung bedanken. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle Christine Appelt. Sie stand mir bei praktischen Problemen immer zur Seite und hatte stets ein offenes Ohr für mich.

Ebenso möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern für die grandiose Zusammenarbeit und den inspirierenden Ideenaustausch bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für den herzlichen Rückhalt, die tatkräftige Unterstützung und die liebevollen Ermutigungen während der ganzen Entstehungszeit bedanken. Ich wäre ohne euch nie so weit gekommen.

14. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad. Ich erkläre, dass ich die Dissertation oder Teile davon nicht bereits bei einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eingereicht habe und dass sie dort weder angenommen noch abgelehnt wurde. Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin vom 5. März 2015. Weiterhin erkläre ich, dass keine Zusammenarbeit mit gewerblichen Promotionsbearbeiterinnen / Promotionsberatern stattgefunden hat und dass die Grundsätze der Humboldt-Universität zu Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten wurden.

Berlin, den 14.02.2020

Stephanie Heller